

50376.  
1999.  
141

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE**

**UFR de Biologie**

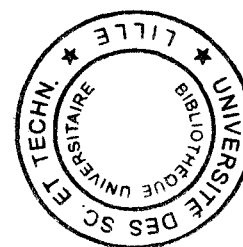
Numéro d'ordre: 2514

**THESE**

**Présentée à l'Université de Lille I  
pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE  
Option : Neurosciences**

Par

**Vincent PREVOT**



**ETUDE SUR LA MODULATION DE LA SECRETION DE GnRH DANS LA  
ZONE EXTERNE DE L'EMINENCE MEDIANE : IMPLICATION D'UNE  
PLASTICITE STEROÏDO-DEPENDANTE ET RÔLE DU  
MONOXYDE D'AZOTE.**

**Soutenue le 26 avril 1999, devant le Jury composé de :**

<b>Président :</b>	<b>Monsieur le Professeur Jean-Paul DUPOUY</b>
<b>Rapporteurs :</b>	<b>Madame le Docteur Marie-Laure KOTTLER</b> <b>Monsieur le Professeur Gérard TRAMU</b>
<b>Examineur :</b>	<b>Monsieur le Docteur William ROSTENE</b>
<b>Directeur de thèse :</b>	<b>Monsieur le Docteur Jean-Claude BEAUVILLAIN</b>

**à mes Parents,**

**sans l'aide de qui rien n'aurait été possible.**

**à Carine**

**à Sophie**

**à Stéphane**

J'exprime tous mes remerciements à :

Madame le Docteur Marie-Laure Kottler et Monsieur le Professeur Gérard Tramu qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail. Ils ont consacré leur temps, que je sais précieux, à sa critique et à son évaluation.

Monsieur le Docteur William Rostène pour sa présence en tant qu'examineur. Qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance pour avoir accepté de juger cette thèse.

Monsieur le Professeur Jean-Paul Dupouy pour avoir accepté de présider ce jury.

Monsieur le Docteur Jean Claude Beauvillain qui m'a accueilli voilà déjà quatre ans dans son laboratoire. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance, non seulement pour avoir encadré de manière remarquable mon travail de thèse, mais aussi pour m'avoir écouté et aidé aussi bien sur le plan professionnel que personnel. Je le remercie pour m'avoir toujours encouragé et m'avoir appris le métier de chercheur. Jean-Claude, ce fut un réel plaisir de travailler sous votre direction. Merci.

Je tiens à remercier vivement :

Madame le Docteur Dominique Croix avec qui cela a été un réel plaisir de travailler pendant ces quatre années. Je tiens à rendre hommage à son enthousiasme et à son dynamisme. Nous avons travaillé ensemble avec une grande complicité. Dominique, je te remercie de la confiance que tu as bien voulu placer en moi et pour ton amitié.

Doctor George B. Stefano with whom it was a great honor to collaborate. George, working with you was fascinating. I thank you for the enthusiasm you communicated to me, as you say 'Research is Rock'n Roll'. I have learnt a lot with you. Thanks a lot.



Madame le Docteur Valérie Mitchell qui m'a enseigné avec beaucoup de patience la technique d'hybridation *in situ*, et avec qui j'ai passé des congrès mémoriaux.

Monsieur Sébastien Bouret qui lors de ces deux dernières années m'a beaucoup aidé, et avec qui j'ai pu partager ma passion pour la recherche. J'ai trouvé là un ami.

Madame Soizic Dutoit pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée dans la réalisation d'une partie de ce travail, et je rend hommage à sa grande compétence technique.

Je remercie également :

Monsieur le Docteur Guy Naulleau, herpétologue de renom, pour m'avoir communiqué très jeune sa passion pour la recherche scientifique, et m'avoir accueilli en stage dans son équipe lors de mes premières années d'études.

Monsieur le Professeur Michel Thérissod et Madame le Docteur Hélène Thérissod pour leur amitié, pour l'attention qu'ils ont portée au déroulement de mes études.

Monsieur le Docteur Luc Buée pour sa grande disponibilité, ses précieux conseils et les nombreuses conversations scientifiques riches en enseignements que nous avons partagées.

Madame le Docteur Maryvonne Warembourg, et Messieurs les Docteurs Pierre Poulain et Bernard Carette, pour l'aide qu'ils m'ont apportée à plusieurs reprises lors de ce travail de thèse.

Mesdames Danièle Leroy et Laurence Dufourny pour les nombreux conseils techniques dont elles m'ont fait bénéficier.

Mesdames Christine Kubisiak et Joëlle Vermeeren pour l'aide qu'elle m'ont apportée dans la préparation des tampons pour l'hybridation *in situ*.

Monsieur Daniel Duvieubourg pour sa bonne volonté et son travail admirable d'animalier.

Ce travail a été réalisé à l'Unité 422 INSERM, laboratoire de Neuroendocrinologie et physiopathologie neuronale, et a donné lieu aux publications et communications suivantes :

## Articles

### *Publiés :*

- **Prevot V., Croix D., Rialas CM., Poulain P., Fricchione GL., Stefano GB., Beauvillain J-C.** (1999) Estradiol Coupling to Endothelial Nitric Oxide Stimulates GnRH Release from Rat Median Eminence via a Membrane Receptor. *Endocrinology* 140:652-659.
- **Prevot V., Dutoit S., Croix D., Tramu G., Beauvillain J-C.** (1998) Semi-quantitative ultrastructural analysis of the localization and neuropeptide content of GnRH nerve terminals in the median eminence throughout the estrous cycle of the rat. *Neuroscience* 84:177-191.
- **Prevot V., Rialas C., Croix D., Salzet M., Dupouy J-P., Poulain P., Beauvillain J-C., Stefano G.** (1998) Morphine and anandamide coupling to nitric oxide stimulates GnRH and CRF release from rat median eminence : neurovascular regulation. *Brain Research* 790:236-244.

### *Soumis :*

- **Prevot V., Croix D., Bouret S, Dutoit S., Tramu G., Stefano GB., Beauvillain J-C.** Definitive evidence for the existence of plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in the GnRH release *Soumis.*
- **Prevot V., Bouret S., Croix D., Takumi T., Jennes L., Mitchell V., Beauvillain JC.** Evidence that members of the TGF $\beta$  superfamily might play a key role in the regulation of the GnRH neuroendocrine axis: expression of the type I serine-threonine kinase receptor for TGF $\beta$  and activin in GnRH neurons and in associated hypothalamic areas of the female rat. *Soumis.*

## **Symposium**

- **Prevot V.** Implications du monoxyde d'azote (NO) dans les régulations neuroendocriniennes. Conférence sur invitation. Mini-symposium sur le NO organisé dans le cadre de Medlil, Lille, France, mars 1999.
- **Prevot V., Croix D., Mitchell V., Beauvillain J-C.** Bases morpho-physiologiques de l'existence d'une plasticité pour les terminaisons à GnRH de la zone externe de l'éminence médiane. Conférence sur invitation. 27ème Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Lille, France, septembre 1998.

## **Communications Orales**

### *En Anglais :*

- **Prevot V., Salzet M., Croix D., Poulain P., Dupouy J-P., Ralias C. M., Stefano G. B., Beauvillain J-C.** Nitric oxide-induced LHRH secretion in median eminence implicates endothelial cells and  $\mu_3$  receptor. 1ère Journée Scientifique du Réseau LARC-Neuroscience, Mont-Saint-Aignant, France, octobre 1997.

### *En Français :*

- **Prévot V., Dutoit S., Croix D., Beauvillain J-C.** Etude morphofonctionnelle de la libération de la gonadoliberine (GnRH) au cours du cycle oestral chez la rate. Colloque ULB-Lille, Bruxelles, Belgique, janvier 1997.

## **Communications affichées**

- **Prevot V., Croix D., Rialas CM., Fricchione GL., Stefano GB., Beauvillain J-C.** Estradiol Coupling to Endothelial Nitric Oxide Stimulates GnRH Release from Rat

Median Eminence via a Membrane Receptor. 28<sup>TH</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Los Angeles, Novembre 1998. *Soc Neurosc Abstr.* 24:1382.

- **Prevot V.**, Croix D., Ralias C. M., Mortreux G., Stefano G. B., Beauvillain J-C. Mise en évidence que la stimulation des récepteurs  $\mu_3$  et CB1 entraîne une libération de GnRH et de CRF dans l'éminence médiane de rat par une voie de transduction impliquant le NO d'origine endothéliale : régulation neurovasculaire. 5ème forum pluridisciplinaire du club NO, Paris, France, mars 1998.
- **Prévot V.**, Dutoit S., Croix D., Beauvillain J-C. Etude morphofonctionnelle de la libération de la gonadolibérine (GnRH) au cours du cycle oestral chez la rate. XXVème Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Strasbourg, France, septembre 1996.

# **SOMMAIRE**

<b>Introduction</b>	<b>p1</b>
<b>I. Etat des connaissances sur la régulation du système à gonadolibérine (GnRH)</b>	<b>p1</b>
<b>I.1. Découverte de la GnRH</b>	<b>p1</b>
<b>I.2. Neuroanatomie du système à GnRH</b>	<b>p3</b>
<b>Immunohistochimie</b>	<b>p3</b>
<b>Hybridation <i>in situ</i></b>	<b>p4</b>
<b>I.3. Physiologie du système à GnRH</b>	<b>p5</b>
<b>Mode de sécrétion de la GnRH</b>	<b>p5</b>
<i>a- Définition de ce qu'est une neurohormone</i>	<b>p5</b>
<i>b- La GnRH est une neurohormone dont la sécrétion est cyclique chez la femelle</i>	<b>p5</b>
<i>c- La sécrétion de GnRH est pulsatile chez la femelle et le mâle</i>	<b>p6</b>
<i>d- Mode de sécrétion de la GnRH chez le mouton et les primates</i>	<b>p6</b>
<b>Modulation de la sécrétion de la GnRH par les stéroïdes gonadiques</b>	<b>p7</b>
<b>Modulation de l'expression de l'ARNm de la GnRH, et de celui d'autres facteurs exprimés dans les neurones à GnRH, au cours du cycle œstral</b>	<b>p8</b>
<b>Mode d'action des stéroïdes gonadiques sur la régulation de l'activité des neurones à GnRH</b>	<b>p11</b>
<b>Population neuronales non-GnRH impliquées dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH</b>	<b>p12</b>
<i>a- Les neurones peptidergiques</i>	<b>p12</b>
<i>- Les peptides stimulateurs</i>	<b>p12</b>
<i>Neuropeptide Y.</i>	<b>p12</b>
<i>Galanine.</i>	<b>p13</b>
<i>Neurotensine.</i>	<b>p14</b>
<i>- Les peptides inhibiteurs</i>	<b>p15</b>
<i>Peptides opioïdes.</i>	<b>p15</b>
<i>Tachykinines.</i>	<b>p17</b>

<i>b- Les catécholamines</i>	p18
<i>Dopamine.</i>	P18
<i>Noradrénaline.</i>	P18
<i>c- Les acides aminés excitateurs</i>	p19
<i>d- Le GABA</i>	p21
<i>e- Les neurones synthétisant le monoxyde d'azote (NO)</i>	p22
<b>Interactions neuro-gliales et système à GnRH</b>	p24
<i>a- Facteurs de croissance gliaux</i>	p24
<i>b- Plasticité neurogliale</i>	p26
<b>II. Généralités sur l'éminence médiane</b>	<b>p27</b>
<b>II.1. Anatomie de l'éminence médiane</b>	p27
<b>II.2. Distribution des fibres et des terminaisons du système à GnRH</b>	p28
<b>II.3. Mise en évidence de régulations paracrines et/ou autocrines dans la zone externe de l'éminence médiane</b>	p30
<b>II.4. Régulations de la libération de GnRH au niveau de l'éminence médiane</b>	p31
<b>Mode de sécrétion <i>in vitro</i></b>	p31
<i>Sécrétion basale de GnRH.</i>	p31
<i>Modulation de la sécrétion basale de GnRH par les stéroïdes gonadiques.</i>	p33
<b>Régulation de la sécrétion de la GnRH au niveau des terminaisons de la zone externe de l'éminence médiane par des facteurs neuronaux</b>	p35
<i>Implication de la GnRH dans la régulation de sa propre sécrétion.</i>	p35
<i>Implication des catécholamines dans la régulation de la libération de GnRH.</i>	p36
<i>Implication des acides aminés excitateurs dans la régulation de la libération de GnRH.</i>	p37
<i>Implication du GABA</i>	p38



<b><i>Régulation de la sécrétion in vitro de GnRH par les neuropeptides stimulateurs et inhibiteurs</i></b>	p39
<i>a- Les neuropeptides stimulateurs</i>	p39
<i>NPY.</i>	p39
<i>Galanine.</i>	p40
<i>Neurotensine.</i>	p41
<i>b- Les neuropeptides inhibiteurs</i>	p41
<i>Peptides opioïdes.</i>	p41
<i>Tachykinines.</i>	p42.
<i>Corticolibérine (CRF).</i>	p42
<b><i>Régulation de la sécrétion de GnRH in vitro par les facteurs de croissance d'origine centrale ou périphérique</i></b>	p42
<i>Les TGFs.</i>	p42
<i>Les IGFs.</i>	P44
<b><i>Régulation de la libération de GnRH in vitro par la leptine</i></b>	p44
<b><i>Régulation de la libération de GnRH au niveau de l'éminence médiane par le NO</i></b>	P44
<b>II.5. Notion de plasticité neuro-gliale dans l'éminence médiane</b>	p45
<b>II.6. Conclusion</b>	p47
<b>Objectifs</b>	<b>p48</b>
<b>Résultats</b>	<b>p49</b>
<b>I. Mise en évidence d'une plasticité morphologique stéroïdo-dépendante de la zone externe de l'éminence médiane</b>	<b>p49</b>
Article 1.	p51
Article 2.	p66
Résumé des résultats des articles 1 et 2	p89

<b>II. Expression d'un récepteur sérine-thréonine kinase au TGF<math>\beta</math> et à l'activine dans les neurones à GnRH, les tanocytes et les capillaires porte</b>	<b>p91</b>
Article 3.	p93
Résumé des résultats de l'article 3	p97
<b>III. Implication du NO dans la modulation de la sécrétion de GnRH dans la zone externe de l'éminence médiane</b>	<b>p98</b>
<b>III.1. Libération de GnRH induite par la morphine et l'anandamide via l'activation des récepteurs <math>\mu_3</math> et CB1 et la sécrétion de NO : implication de l'endothélium ?</b>	<b>p98</b>
Article 4.	p100
Résumé des résultats de l'article 4	p109
<b>III.2. Libération de GnRH induite par l'œstradiol via l'activation d'un récepteur membranaire et la sécrétion de NO d'origine endothéliale</b>	<b>p110</b>
Article 5.	p111
Résumé des résultats de l'article 5	p119
<b>Discussion</b>	<b>p120</b>
<b>I. Sécrétion de GnRH et plasticité</b>	<b>p120</b>
<b>I.A. La sécrétion de GnRH est au cours du cycle œstral, sous la dépendance d'une plasticité morphologique de la zone externe de l'éminence médiane</b>	<b>p120</b>
<b>I.B. Activine et/ou TGF<math>\beta_1</math> médiateurs de plasticité ?</b>	<b>p125</b>
<b>II. Modulation de la sécrétion de GnRH dans l'éminence médiane</b>	<b>p127</b>
<b>II.A. Variation du contenu des terminaisons à GnRH en décapeptide au cours du cycle œstral</b>	<b>p127</b>
<b>II.B. Implication du NO dans la modulation de la libération de GnRH au niveau de l'éminence médiane</b>	<b>p131</b>
<b>Conclusion</b>	<b>p136</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>p139</b>

# **INTRODUCTION**

# Introduction

## I. Etat des connaissances sur la régulation du système à gonadolibérine (GnRH)

La GnRH est une neurohormone synthétisée dans les corps cellulaires de neurones distribués de manière diffuse dans l'aire préoptique et l'hypothalamus. Ce neuropeptide est sécrété par des terminaisons neuroendocriniennes localisées dans l'éminence médiane. Une fois sécrétée, la GnRH entre dans les vaisseaux portes hypophysaires, et est transportée vers l'hypophyse antérieure, où elle module la synthèse et la libération des gonadotrophines, LH (hormone lutéinisante) et FSH (hormone folliculostimulante), indispensables pour le bon déroulement de la gamétogénèse et la survenue de l'ovulation.

### I.1. Découverte de la GnRH

En 1960, Mc Cann *et al.* montrent que l'hypothalamus de rat contient une substance capable de stimuler la libération de LH par l'antéhypophyse. A l'aide de dosages biologiques, Mc Cann (1962) localise cette substance dans l'aire préoptique, l'aire suprachiasmatique, l'éminence médiane et le noyau arqué. Les laboratoires de Guillemin et de Schally isolent, en 1971, ce facteur hypophysiotrope capable de stimuler la libération de LH et déterminent qu'il s'agit d'un décapeptide de séquence pyroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly.NH<sub>2</sub>, qu'ils nomment "Luteinizing Hormone Releasing Hormone" ou LHRH (Amos *et al.*, 1971 ; Schally *et al.*, 1971) ; par la suite, ce neuropeptide portera différentes dénominations, dont "Gonadotropin Releasing Factor" ou LRF et "Gonadotropin Releasing Hormone" ou GnRH. La synthèse de ce neuropeptide (Matsuo *et al.*, 1971 ; Monahan *et al.*, 1971 ; Sievertsson *et al.*, 1971) a permis l'élaboration d'anticorps spécifiques de cette molécule et la caractérisation immunohistochimique du système (voir pour revue, Barry 1979 ; Knigge *et al.*, 1980). En 1991, un variant post-traductionnel de la GnRH a été isolé à partir d'hypothalamus de plusieurs mammifères par Gautron *et al.* : la [hydroxyproline<sup>9</sup>]GnRH ([hyp<sup>9</sup>]GnRH). La stimulation par ce variant de la sécrétion des

hormones gonadotropes (LH et FSH) par l'antéhypophyse (Gautron *et al.*, 1992), est moins efficace que celle induite par la GnRH, cependant l'[hyp<sup>9</sup>]GnRH pourrait jouer un rôle majeur pendant la gestation en stimulant la sécrétion de l'hCG placentaire (Currie *et al.*, 1992). En outre, chez le fœtus l'[hyp<sup>9</sup>]GnRH constitue 85% de l'immunoréactivité totale "GnRH-like" de l'hypothalamus (Gautron *et al.*, 1991). Par ailleurs, le catabolisme de l'[hyp<sup>9</sup>]GnRH entraîne la production de fragments C-terminaux dont la demi-vie est supérieure à celle des fragments C-terminaux issus du clivage de la GnRH (Gautron *et al.*, 1993). Ces fragments sont retrouvés en quantités importantes dans les structures hypothalamiques et extra-hypothalamiques (bulbe olfactif et hippocampe) ; leur fonction est inconnue.

Une douzaine d'isoformes de la GnRH sont connues chez les vertébrés ; toutes sont des décapeptides qui ont conservé entre 10 et 50 % d'homologie avec la première forme de GnRH découverte (Sherwood *et al.*, 1993). L'une de ces isoformes, la [His<sup>5</sup>, Trp<sup>7</sup>, Tyr<sup>8</sup>] GnRH, nommée GnRH-II, isolée au départ dans le cerveau de poulet (Miyamoto *et al.*, 1984) est une forme de GnRH très conservée au cours de l'évolution qui est apparue il y a plus de 500 millions d'années chez les premières espèces métamériques (King *et al.*, 1994) et est détectée dans le cerveau de la plupart des classes de vertébrés. La présence de ce décapeptide chez les mammifères placentaires n'a été détectée que très récemment (Lescheid *et al.*, 1997 ; White *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 1998) mais sa fonction reste inconnue. A en juger par la haute conservation de ce neuropeptide au cours de l'évolution, sa fonction pourrait s'avérer capitale.

Le gène codant pour la GnRH a été localisé sur un simple *locus* du chromosome 8 chez l'homme (Yang-Feng *et al.*, 1986) et sur le chromosome 14 chez la souris (Williamson *et al.*, 1991). La caractérisation de l'ADNc du gène codant pour la GnRH par Seeburg et Adelman en 1984 a permis de montrer que le décapeptide était issu de la modification post-traductionnelle d'une molécule précurseur appelée préproGnRH. La préproGnRH est une molécule de 92 acides aminés, au sein de laquelle le décapeptide GnRH est précédé d'un peptide signal de 23 acides aminés et suivi par une séquence Gly-Lys-Arg nécessaire au processus de protéolyse et à l'amidation en carboxyterminal de la GnRH (Seeburg et Adelman, 1984). La séquence de 56 acides aminés restante a été dénommée "GnRH

associated peptide'' (GAP). Ce peptide s'est révélé être un très puissant inhibiteur de la sécrétion de prolactine (Nickolics *et al.*, 1985).

## I.2. Neuroanatomie du système à GnRH

### **Immunohistochimie**

Léonardelli *et al.* (1973) sont les premiers à montrer, par immunofluorescence, la localisation des fibres à GnRH dans le cerveau de rongeur et à déterminer que les axones des neurones à GnRH se terminaient autour du plexus porte primaire de l'hypophyse. Grâce à l'utilisation de colchicine Barry, dès 1973 (a,b), localise les corps cellulaires des neurones à GnRH chez le cobaye. Le nombre exact des neurones à GnRH dans les différentes espèces n'a pu être établi, avec certitude, que dans les années 80 suite à l'avènement de coupes réalisées au vibratome. Ainsi, il a été déterminé que les neurones à GnRH constituaient une très petite population neuronale (environ 800 chez le hamster (Jennes et Stumpf, 1980), 1600 chez le rat (Wray et Hoffman, 1983), et 2400 chez le babouin (Marshall et Goldsmith, 1980) ; de plus la localisation de leur corps cellulaire est très dispersée dans le cerveau antérieur (pour revue voir Barry *et al.*, 1985). Chez le rat, la majorité des cellules immunoréactives pour la GnRH est localisée dans les régions septales, préoptiques et hypothalamiques, formant un continuum lâche depuis les bandes diagonales de Broca en passant par les noyaux septaux médian et triangulaire, l'aire préoptique périventriculaire, médiane et latérale, et les aires hypothalamiques antérieures. Quelques neurones à GnRH sont localisés dans les organes circumventriculaires, tels que l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) et l'organe subfornical. Enfin, certains neurones à GnRH sont associés au bulbe olfactif accessoire et à d'autres structures du bulbe, dont le nerf terminal. Les premières études immunohistochimiques du système à GnRH ont par ailleurs permis de définir avec précision la localisation des différents faisceaux de fibres se projetant des structures antérieures jusqu'au site de sécrétion de la GnRH : l'éminence médiane (Merchantaler *et al.*, 1980, 1984 ; Kawano et Daikoku, 1981 ; Hoffman et Gibbs, 1982 ; King *et al.*, 1982). Cependant la localisation précise des cellules à GnRH participant à cette

neurosecrétion n'a pu être établie qu'avec l'utilisation de traceurs rétrogrades qui ont été injectés, soit directement au niveau de l'éminence médiane (Silverman *et al.*, 1987), soit dans la circulation générale (Jennes et Stumpf, 1986 ; Witkin, 1990). Ces études ont permis de conclure qu'au moins 50 % des neurones à GnRH se projetaient vers l'éminence médiane et que le corps cellulaire de ces neurones n'avait pas de distribution particulière (Silverman *et al.*, 1987). D'après Witkin (1990), environ 90 % des neurones à GnRH se projettent vers les organes circumventriculaires (éminence médiane, OVLT et organe subfornical), et cette proportion ne varierait pas selon le sexe, ni selon l'état physiologique de l'animal. Par ailleurs, un certain nombre de neurones à GnRH se projettent dans diverses régions du système nerveux central comme l'amygdale médiane (Leonardelli et Poulain, 1977 ; King *et al.*, 1982), et le cerveau moyen (Witkin *et al.*, 1982 ; Merchantaler *et al.*, 1984). Ainsi, la GnRH pourrait jouer le rôle de neurotransmetteur et/ou de neuromodulateur dans le système nerveux central.

### **Hybridation *in situ***

La combinaison d'une technique d'immunohistochimie pour détecter le décapeptide, avec une technique d'hybridation *in situ* pour détecter l'ARNm de la préproGnRH, a permis à Ronnekliev *et al.* (1989) d'établir que le peptide et l'ARNm de la GnRH pouvaient être le plus souvent détectés dans les mêmes cellules. Nous noterons que tous les neurones immunoréactifs pour la GnRH ne contiennent pas des taux détectables d'ARNm de la GnRH, et inversement, et ceci aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles. Cette étude montre par ailleurs que la corrélation entre le nombre de neurones immunomarqués et le nombre de neurones exprimant l'ARNm de la GnRH, sur une même coupe, est plus forte chez la femelle le jour du proœstrus que chez le mâle normal : ceci suggère que, le jour du proœstrus, la transcription du gène de la GnRH serait le plus souvent associée à la synthèse de sa protéine.

### I.3. Physiologie du système à GnRH

#### **Mode de sécrétion de la GnRH**

##### a- Définition de ce qu'est une neurohormone

En 1972 Harris définit les "releasing factor" hypothalamiques, ou neurohormones, comme étant (a) des substances que l'on pouvait extraire à partir de fragments d'éminence médiane, (b) des substances présentes dans le sang porte hypophysaire à des taux plus élevés que dans la circulation générale, et (c) des substances dont les variations de concentrations dans le sang porte étaient liées à la variation des taux de sécrétion de l'une des hormones antéhypophysaires, dans un certain nombre de conditions physiologiques ou expérimentales.

##### *b- La GnRH est une neurohormone dont la sécrétion est cyclique chez la femelle*

L'équipe de Schally montre que la GnRH stimule la libération de LH et de FSH chez toutes les espèces étudiées, dont l'homme (pour revue voir Schally 1978). Fink et Jameison (1976) montrent que la stimulation électrique de l'aire préoptique, connue pour stimuler la sécrétion de LH par l'hypophyse (Fink et Aiyer, 1974), accroît de manière significative les taux de GnRH dans le sang porte hypophysaire chez le rat, et ce, aussi bien chez le mâle que chez la femelle. De plus, ces auteurs montrent que les concentrations en GnRH du sang porte sont significativement supérieures à celles mesurées dans le sang prélevé dans la veine jugulaire. Enfin, en 1976, Sarkar *et al.* montrent, chez le rat, que le pic préovulatoire de LH est précédé d'une sécrétion massive de GnRH dans le sang porte hypophysaire, le soir du proœstrus. Les études ultérieures ont mis en évidence que l'accroissement des taux d'œstradiol plasmatiques entre le soir du diœstrus et l'après-midi du proœstrus était le principal facteur responsable de la survenue du pic préovulatoire de GnRH l'après-midi du proœstrus (Fink *et al.*, 1977). La corrélation directe entre le pic de GnRH survenant le soir du proœstrus dans le sang porte hypophysaire, et les pics préovulatoires de LH et de FSH dans la circulation générale des mêmes animaux, n'a été établie de manière définitive, chez le rat, qu'en 1982 par l'étude de Ching et celle de Levine et Ramirez.

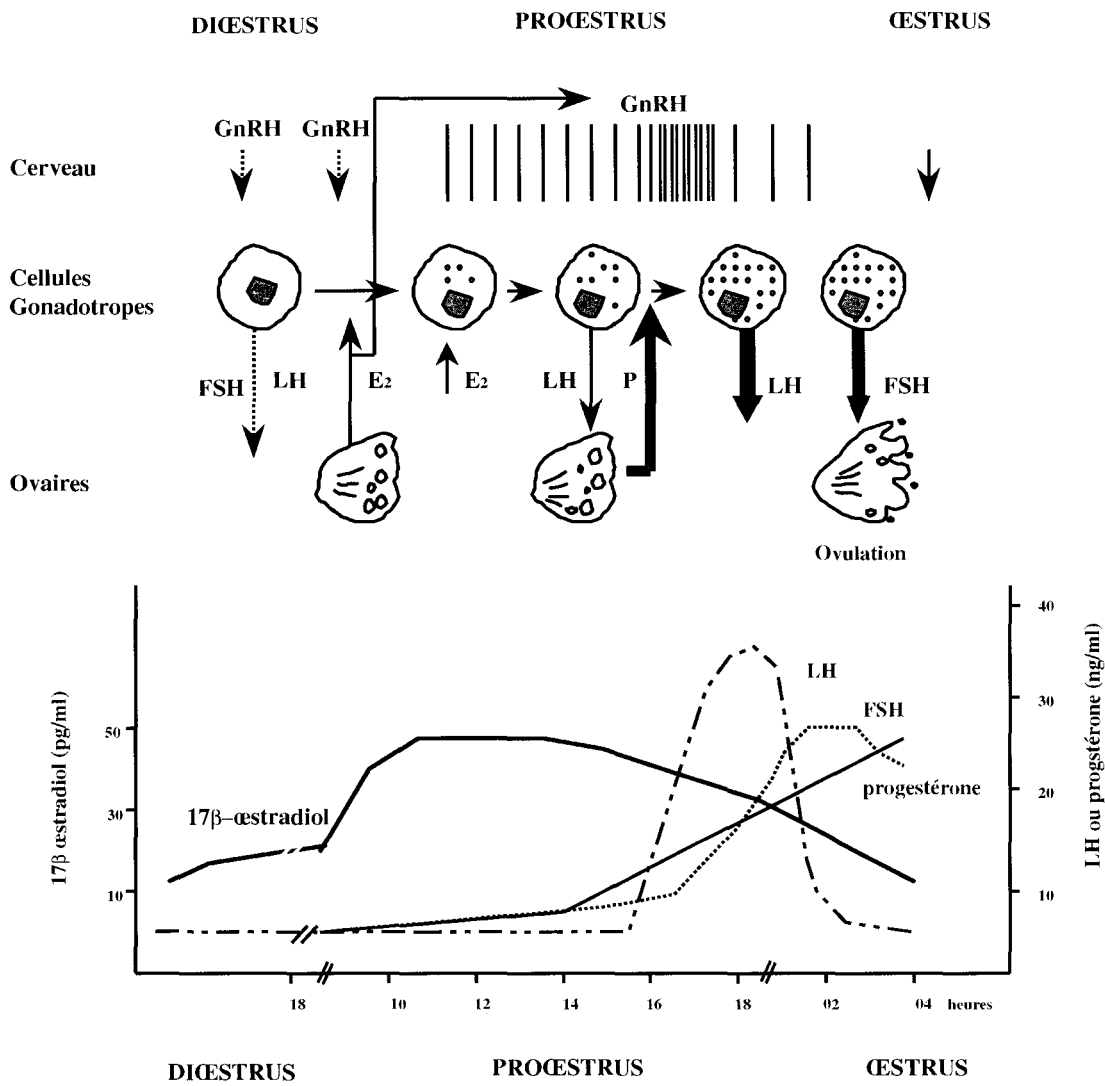


### *c- La sécrétion de la GnRH est pulsatile chez la femelle et chez le mâle*

Levine et Ramirez (1982) ont démontré, chez la rate non anesthésiée, à l'aide d'une technique de push pull cannula, que la sécrétion de GnRH dans le sang porte était pulsatile, et que la survenue du pic préovulatoire de GnRH était due à une augmentation de l'amplitude des pulses et non de leur fréquence. Cette sécrétion pulsatile de la GnRH chez la rate a été confirmée par différents auteurs (Park et Ramirez, 1989 ; Sarkar et Minami, 1995). Par ailleurs, il a été montré chez le rat mâle, par l'utilisation de la même technique, que la sécrétion de la GnRH dans le sang porte était elle aussi pulsatile (Steiner *et al.*, 1982 ; Dluzen et Ramirez, 1987 ; Levine et Duffy, 1988 ; Phelps *et al.*, 1992). Levine et Duffy montrent en 1988, qu'une libération pulsatile de LH est corrélée dans le temps à la libération pulsatile de GnRH chez le mâle. Ainsi, à la fin des années 80, il est définitivement établi que la libération pulsatile de GnRH est la condition neurohumorale déterminante permettant la sécrétion pulsatile de LH chez les rats mâles et femelles. A l'opposé, il apparaît aussi bien chez le mâle (Levine et Duffy, 1988), que chez la femelle (De Paolo, 1985), que la sécrétion de FSH est beaucoup moins dépendante que la LH de la sécrétion pulsatile de la GnRH. La GnRH semblerait en effet contrôler la sécrétion basale de FSH, mais pas la pulsativité de sa sécrétion.

### *d- Mode de sécrétion de la GnRH chez le mouton et les primates*

Cette pulsativité de la libération de GnRH, contrôlant la sécrétion pulsatile de LH, se retrouve dans d'autres espèces. Des études entreprises chez le mouton (Clarke *et al.*, 1985 ; Moenter *et al.*, 1990, 1991 ; Clarke, 1993) et le singe (Levine *et al.*, 1985 ; Xia *et al.*, 1992 ; Chongthammakun et Terasawa, 1993 ; Pau *et al.*, 1993) montrent que le pic préovulatoire de LH, ainsi que le pic de LH induit par les œstrogènes, étaient accompagnés d'un accroissement de la libération pulsatile de GnRH. Chez le mouton, la fréquence des pulses de GnRH augmente pendant le pic de LH, mais pas leur amplitude (Caraty *et al.*, 1989 ; Clarke, 1993) ; en revanche, chez le singe, à la fois l'amplitude et la fréquence des pulses de GnRH augmentent (Xia *et al.*, 1992 ; Chongthammakun et Terasawa, 1993 ; Pau *et al.*, 1993).



**Figure 1.** Activité de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadotrope au cours du cycle œstral chez la rate

## Modulation de la sécrétion de la GnRH par les stéroïdes gonadiques

Chez la femelle les œstrogènes semblent être les déterminants majeurs pour le fonctionnement du système à GnRH (Figure 1.). Les œstrogènes véhiculent la rétroaction homéostatique classique des gonades vers le cerveau, et s'avèrent être des facteurs critiques contrôlant l'activité de biosynthèse et le mode de sécrétion du système à GnRH. Pendant la plus grande partie du cycle œstral, les œstrogènes jouent le rôle de frein pour la sécrétion de LH, à travers ce qui est appelé une "rétroaction négative". Dans la plupart des espèces, cette action négative de l'œstradiol sur la sécrétion de LH passe par une inhibition de la sécrétion de GnRH (Caraty *et al.*, 1989 ; Sarkar et Fink, 1980 ; Chongthammakun et Terasawa, 1993 ; Evans *et al.*, 1994), mais implique aussi une forte action des œstrogènes sur les cellules gonadotropes hypophysaires (pour revur voir Shupnik, 1996). La "rétroaction positive" des œstrogènes sur les neurones à GnRH et sur les cellules gonadotropes hypophysaires est, quant à elle, à l'origine de la survenue du pic préovulatoire de LH. Il est à l'heure actuelle admis, chez plusieurs espèces, que les œstrogènes sont de puissants stimulateurs de la sécrétion de GnRH par les terminaisons de l'éminence médiane lors de l'initiation du pic de LH (Sarkar *et al.*, 1976 ; Ching, 1982 ; Caraty *et al.*, 1989 ; Moenter *et al.*, 1990 ; Pau *et al.*, 1993 ; Xia *et al.*, 1992 ; Levine *et al.*, 1985 ; Clarke, 1993 ; Evans *et al.*, 1995). Il est tout particulièrement important de noter que chez le rat, le mouton et les primates, la survenue du pic de GnRH n'est possible que si le système à GnRH a été exposé pendant une période d'environ 15 h à des concentrations relativement élevées d'œstrogènes (Moenter *et al.*, 1990 ; Sarkar et Fink, 1980 ; Xia *et al.*, 1992). Il semble en effet qu'une exposition prolongée à de forts taux d'œstrogènes soit indispensable pour la mise en place des systèmes neuronaux responsables de la genèse du pic préovulatoire de GnRH ; en revanche, lors du pic lui même, la présence d'œstrogènes ne semble pas être une condition nécessaire à sa survenue (Evans *et al.*, 1997). Nous noterons aussi que, contrairement au mouton et au singe chez qui les œstrogènes se suffisent à eux mêmes pour engendrer un pic de GnRH/LH normal, chez la rate, la présence de progestérone est indispensable pour la survenue du pic préovulatoire de GnRH/LH (voir Kalra, 1993). La progestérone serait l'élément déclenchant de la libération de la GnRH au niveau des terminaisons neuroendocrines de l'éminence médiane (voir Kalra,

1993). Etant donné que les œstrogènes sont indispensables pour l'induction de la synthèse des récepteurs à la progestérone, il est vraisemblable que les œstrogènes et la progestérone exercent un effet synergique sur le système à GnRH immédiatement avant, ou pendant la survenue du pic préovulatoire de GnRH chez le rat (voir Levine, 1997). Après le pic, chez le rat, comme chez les autres espèces, la progestérone a un effet inhibiteur sur la sécrétion de GnRH (voir Kalra, 1993).

*Chez le rat mâle* la testostérone est l'hormone stéroïdienne responsable de la rétroaction exercée par les gonades sur le cerveau. La testostérone est supposée réguler négativement la sécrétion de GnRH afin de maintenir un mode de sécrétion basal de LH, nécessaire à une fonction testiculaire optimale (voir Kalra et Kalra, 1989).

### **Modulation de l'expression de l'ARNm de la GnRH, et de celui d'autres facteurs exprimés dans les neurones à GnRH, au cours du cycle œstral**

Plusieurs études ont été menées afin de déterminer si l'expression de l'ARNm de la GnRH variait au cours du cycle œstral. Cependant, ces études ont presque toutes produit des résultats contradictoires. D'après Zoeller et Young (1988) les taux d'expression des ARNm de la GnRH / cellule seraient à leur plus bas niveau, le matin du proœstrus, puis l'après-midi, ils augmenteraient d'un facteur deux, concomitamment avec la survenue du pic préovulatoire de LH. Les taux des messagers resteraient ensuite élevés pendant les jours de l'œstrus et du diœstrus I (Zoeller et Young, 1988). Parallèlement, Park *et al.* (1990) ont trouvé un fort accroissement du nombre de cellules exprimant l'ARNm de la GnRH l'après-midi du proœstrus. Les taux d'expression de l'ARNm de la GnRH / cellule n'a pas été quantifié, ce qui limite les comparaisons entre les deux études (Zoeller et Young, 1988, Park *et al.*, 1990) ; néanmoins ces deux études montrent une augmentation de l'expression du gène de la GnRH le jour du proœstrus, au moment du pic de LH. Une autre approche menée par Gore et Robert (1995) met en évidence deux pics d'expression de l'ARNm de la GnRH pendant le cycle œstral : l'un survenant le jour du diœstrus II et l'autre l'après-midi du proœstrus. Il est intéressant de noter que les auteurs ont parallèlement détectés, le jour du proœstrus, une

élévation du taux de transcrits primaires dans le noyau, traduisant une augmentation du taux de transcription de l'ARNm de la GnRH. Ce phénomène n'a pas été retrouvé en diœstrus II, suggérant que le pic d'ARNm observé ce jour là, dans les cellules à GnRH, ne serait pas dû à une augmentation du taux de transcription du gène de la GnRH, mais à la mise en place de phénomènes post-transcriptionnels conduisant à une augmentation de la stabilité d'ARNm de la GnRH (Gore and Roberts, 1995). L'utilisation d'une technique de RT-PCR n'a pas permis à Suzuki *et al.* (1995) de retrouver des résultats comparables à ceux de l'étude précédente. En effet, ces auteurs rapportent que les taux d'ARNm de la GnRH ne varient pas les jours du diœstrus I et II, et qu'ils augmentent pour arriver à un pic de concentration à 11h le jour du proœstrus. L'après-midi du proœstrus les taux d'ARNm de la GnRH chutent pour arriver à des taux de base à 16h, puis augmentent de nouveau le soir même, pour atteindre un nouveau pic de concentration à 11h le jour de l'œstrus.

D'autres études, cependant, ne montrent ni de changement en nombre de cellules exprimant l'ARNm de la GnRH, ni de variation du taux d'expression de l'ARNm de la GnRH / cellule au cours du cycle œstral (Malik *et al.*, 1991 ; Marks *et al.*, 1993, 1994). Les mêmes périodes du cycle œstral ayant été analysées, la raison d'un tel désaccord n'est pas claire.

Actuellement, l'étude de référence concernant la quantification de l'ARNm de la GnRH au cours du cycle œstral apparaît être la publication de Porkka-Heiskanen *et al.* (1994). Ce travail est particulièrement intéressant dans la mesure où les auteurs répartissent les neurones à GnRH en sous-populations selon leur localisation anatomique (bande diagonale de Broca, aire préoptique rostrale / OVLT, aire préoptique médiane, aires suprachiasmatique et hypothalamique antérieure). De cette façon, ils montrent que le nombre de cellules exprimant l'ARNm de la GnRH varie de manière différente au cours du cycle œstral selon la région considérée. En effet ces auteurs observent un nombre accru de cellules exprimant l'ARNm de la GnRH à 12h le jour du proœstrus dans l'aire préoptique médiane, et à 18h au niveau de l'aire préoptique rostrale / OVLT. Cependant aucune variation du taux d'expression des ARNm de la GnRH / cellule n'a été observée.

Au vu de l'ensemble de ces résultats souvent contradictoires, l'éventuelle rétroaction positive des œstrogènes sur l'expression de l'ARNm de la GnRH est difficile à établir. La rétroaction positive des œstrogènes sur l'activité des neurones à GnRH pourrait se traduire,

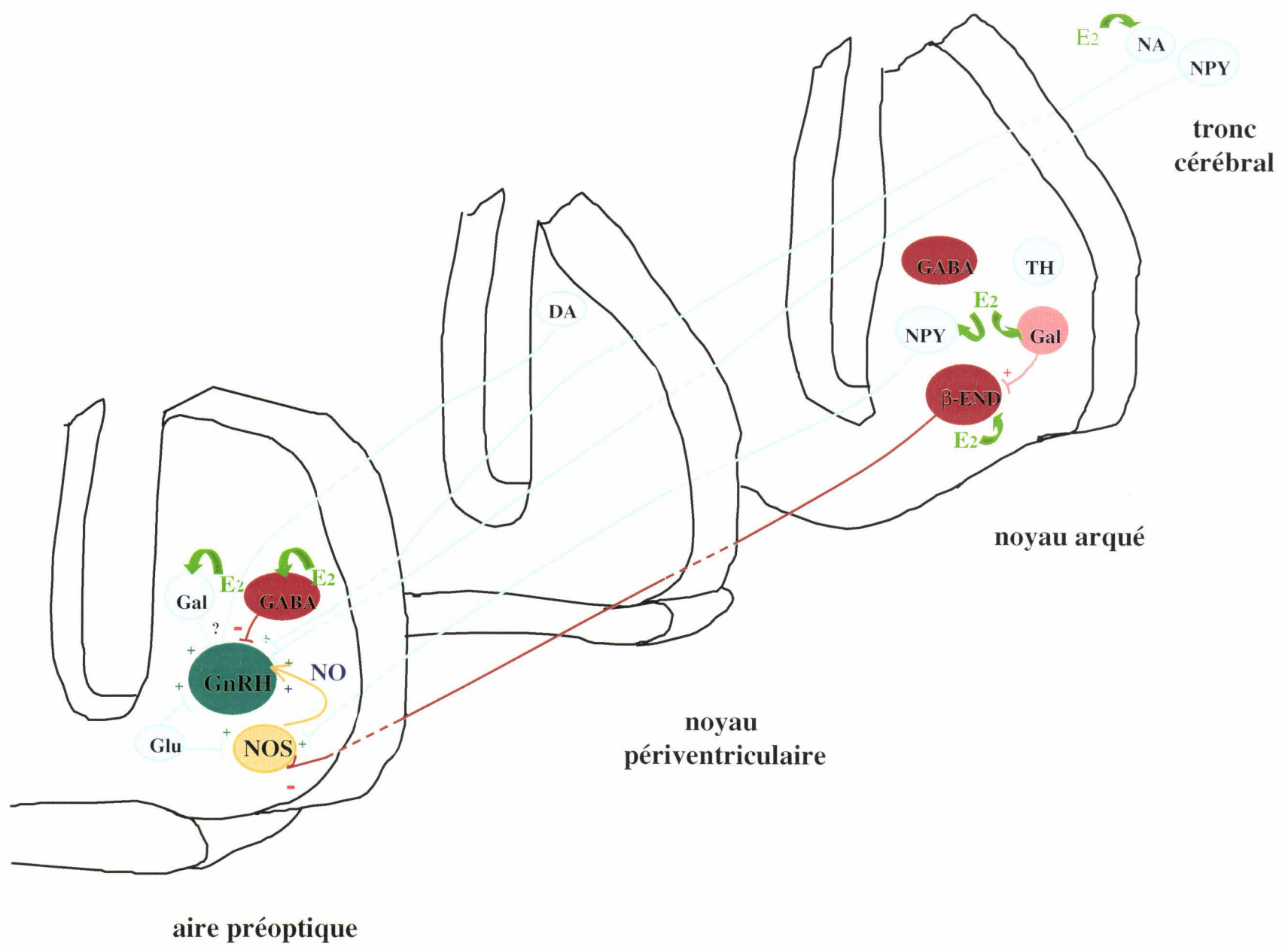
en plus d'une modification de l'expression de l'ARNm de la GnRH, par une augmentation de la transcription d'autres gènes exprimés dans les neurones à GnRH. Ces gènes seraient responsables de l'initiation des événements indispensables pour une sécrétion accrue de GnRH pendant le pic préovulatoire ainsi que du rétablissement des stocks de GnRH ou de produits d'autres gènes après la survenue du pic, comme le suggère l'expression des protooncogènes *c-fos* et *c-jun* dans les neurones à GnRH au moment de la survenue du pic préovulatoire de GnRH (Finn *et al.*, 1998 ; Lee *et al.*, 1990, 1993 ; Rubin *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 1995 ). D'après les études de Bruder, Spauling et Wierman (1996) réalisées sur le promoteur de la GnRH, la protéine Fos inhiberait la transcription du gène de la GnRH en interagissant avec les facteurs de transcription qui sont responsables de l'expression basale de l'ARNm de la GnRH. Les auteurs émettent l'hypothèse que cette compétition entre les différents facteurs de transcription et l'altération de leur activité pourrait constituer un "cross-talk" susceptible d'être à l'origine de l'augmentation de la sécrétion de GnRH.

L'un des gènes candidats, qui pourrait moduler l'activité des neurones à GnRH au moment du pic préovulatoire de LH, est le gène de la galanine. La galanine est un neuropeptide exprimé dans 80% des neurones à GnRH chez la femelle (Merchenthaler *et al.*, 1990, 1991). La colocalisation de la galanine dans les neurones à GnRH semble avoir une grande importance physiologique, puisque la galanine accroît la sécrétion de GnRH (Lopez *et al.*, 1990), et qu'elle est cosécétrée avec la GnRH dans la circulation porte hypophysaire (Lopez *et al.*, 1991 ; Liposits, *et al.*, 1995). Par ailleurs, elle est connue pour interagir avec la GnRH en augmentant son activité hypophysiotrope sur les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure (Coen *et al.*, 1990 ; Lopez *et al.*, 1990). L'hypothèse d'une importante implication physiologique de la galanine exprimée dans les neurones à GnRH chez la femelle est renforcée par l'existence d'un fort dimorphisme sexuel pour son expression dans les neurones à GnRH ; en effet, seuls 20% des neurones à GnRH sont immunoréactifs pour la galanine chez le rat mâle (Merchenthaler *et al.*, 1990, 1991). De plus, l'expression de l'ARNm de la galanine dans les neurones à GnRH varie au cours du cycle œstral. Les taux de coexpression de l'ARNm des deux peptides est au plus haut niveau le jour du proœstrus et celui de l'œstrus, alors qu'il est basal le jour du diœstrus (Marks *et al.*, 1993). Une étude très récente de Finn, Steiner et Clifton (1998) semble montrer que l'induction de l'expression du gène *c-fos* dans les neurones à GnRH au moment du pic

préovulatoire de LH entraîne une augmentation de la transcription du gène de la galanine. Ainsi, cette augmentation du taux d'ARNm de la galanine dans les neurones à GnRH pourrait traduire, soit le besoin de reconstituer les stocks intracellulaires de galanine qui se seraient épuisés au moment de la survenue du pic préovulatoire de GnRH/LH, soit une implication de la galanine dans les mécanismes physiologiques se déroulant le jour de l'œstrus.

### **Mode d'action des stéroïdes gonadiques sur la régulation de l'activité des neurones à GnRH**

L'une des découvertes majeure pour la neurobiologie de la GnRH a été l'observation réalisée par Shivers et *et al.* (1983) montrant que les neurones à GnRH n'accumulaient pas l'œstradiol. L'absence d'expression du récepteur aux œstrogènes dans les neurones à GnRH a été confirmée par les différentes études immunohistochimiques réalisées chez le rat (Herbison et Theodosis, 1992), le cobaye (Watson *et al.*, 1992), le mouton (Herbisson *et al.*, 1993 ; Lehman et Karsch, 1993), le singe (Herbison *et al.*, 1995 ; Sullivan *et al.*, 1995) et le vison (Warembourg *et al.*, 1998). Ces données suggèrent fortement que les œstrogènes ne régulent pas directement le génome des neurones à GnRH dans les différentes espèces de mammifères étudiées. Etrangement, il a été montré que le gène de la GnRH possédait un élément de réponse aux œstrogènes chez le rat et les primates (Radovick *et al.*, 1991, 1994 ; Wierman *et al.*, 1992) ; cependant, l'absence de récepteurs aux œstrogènes dans les neurones à GnRH suggère que la régulation de l'expression de la GnRH n'impliquerait pas l'activation de cet élément de réponse. Il faut toutefois noter que chez le cobaye, King *et al.* (1995) ont décrit l'existence d'une faible population de neurones à GnRH exprimant des récepteurs aux stéroïdes sexuels. Ainsi nous ne pouvons pas écarter la possibilité d'une action des œstrogènes sur la très faible population de neurones à GnRH exprimant le récepteur correspondant. Ces derniers pourraient servir de relais et transmettre l'information aux autres neurones du système à GnRH. Par ailleurs, il a aussi été suggéré par Lopez *et al.* (1998) que les récepteurs aux œstrogènes pourraient être présents dans les neurones à GnRH, mais à des concentrations tellement faibles qu'ils ne pourraient pas être détectés par les techniques actuelles. Mais pour que cette hypothèse soit valable, il faudrait que ces faibles taux de



**Figure 2.** Régulation de l'activité des neurones à GnRH au niveau de l'aire préoptique



récepteurs exprimés soient capables de générer une réponse physiologique suffisante pour agir sur le système.

En fait, à l'exception de ces travaux, il est actuellement considéré que les neurones à GnRH ne renferment pas de récepteurs aux œstrogènes.

Huang et Harlan (1993) ont montré par double immunohistochimie que les récepteurs aux androgènes n'étaient pas non plus exprimés dans les neurones à GnRH. Jusqu'alors, le seul récepteur aux stéroïdes connu pour être largement exprimé dans les neurones à GnRH est le récepteur aux glucocorticoïdes (Ahima et Harlan, 1992).

L'absence de récepteurs aux stéroïdes gonadiques dans les neurones à GnRH suggère fortement que l'action de ces stéroïdes sur la modulation de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadotrope ne passe pas par une action directe des œstrogènes sur les neurones à GnRH. Les alternatives les plus probables sont a) que les stéroïdes gonadiques agissent sur d'autres types neuronaux susceptibles de moduler l'activité des neurones à GnRH par une voie transsynaptique, qu'elle soit monosynaptique ou polysynaptique, et/ou b) que les stéroïdes gonadiques modulent les interactions neuro-gliales des neurones à GnRH, soit au niveau de leur corps cellulaire, soit au niveau de leur terminaison.

## **Populations neuronales non-GnRH impliquées dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH (Figure 2.)**

*a- Les neurones peptidergiques*

- *Les peptides stimulateurs*

**Neuropeptide Y (NPY).** Le NPY possède un rôle facilitateur clair sur la sécrétion de la GnRH et potentialise son action sur les cellules gonadotropes au moment du pic préovulatoire de LH (Kalra, 1993 ; Levine 1997). L'innervation NPYergique de l'hypothalamus et de l'aire préoptique provient essentiellement de deux populations neuronales, l'une localisée dans le noyau arqué et l'autre dans le tronc cérébral (Sahu *et al.*, 1988 ; Ueda *et al.*, 1991). Les neurones à NPY du noyau arqué pourraient être les vecteurs d'une action des œstrogènes sur le système à GnRH car 10% d'entre eux expriment le

récepteur aux œstrogènes chez le rat (Kalra, 1993). Le fait que l'expression de l'ARNm du NPY augmente sous l'influence des œstrogènes (Sahu *et al.*, 1994) et qu'elle soit élevée l'après-midi du proœstrus (Bauer-Dantoin *et al.*, 1992) confirmerait cette hypothèse. Par contre, les neurones à NPY du tronc cérébral ne semblent pas exprimer le récepteur aux œstrogènes (Simonian et Herbison, 1997) et leur activité ne semble donc pas être sous l'influence des stéroïdes gonadiques.

Les effets stimulateurs du NPY, induits par les œstrogènes, sur l'activité des neurones à GnRH s'exercent surtout au niveau de l'éminence médiane (Herbison, 1998). Ceux-ci seront détaillés ultérieurement. Le NPY semble, en outre, agir au niveau des corps cellulaires des neurones à GnRH, mais leur mode d'action à ce niveau n'est pas encore élucidé. Le fait est que les corps cellulaires à GnRH sont entourés de fibres à NPY, qui peuvent aussi bien provenir du tronc cérébral que du noyau arqué (Herbison, 1998). Ces fibres à NPY font parfois synapse avec les corps cellulaires des neurones à GnRH (Tsuruo *et al.*, 1990). Il est intéressant de noter que la concentration en NPY au voisinage des corps cellulaires à GnRH augmente le jour du proœstrus (Sahu *et al.*, 1989) et lors de l'induction du pic de LH par les œstrogènes chez une rate ovariectomisée (Sahu *et al.*, 1990). L'effet de l'augmentation des afférences NPYergiques, dépendante des œstrogènes, sur les corps cellulaires à GnRH est inconnue. Certaines études réalisées chez le mâle suggèrent que le rôle du NPY pourrait être de réguler l'expression du gène de la GnRH (Li *et al.*, 1994).

Nous noterons que d'après Kalra *et al.* (1992), le principal type de récepteur au NPY impliqué dans la régulation de la sécrétion de LH chez la rate serait le récepteur Y-1.

**Galanine.** La galanine est, comme le NPY, un neuropeptide stimulateur de la sécrétion de LH possédant un double site d'action sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (Sahu *et al.*, 1987), mais dont la topographie et le mode d'action diffèrent de ceux du NPY (Skofitsch et Jacobowitz, 1985 ; Melander *et al.*, 1986). L'injection intracérébroventriculaire d'un immunsérum anti-galanine ou d'antagonistes de ses récepteurs n'inhibe pas la survenue du pic de LH mais altère son décours chez la rate en proœstrus (Lopez *et al.*, 1993) ou chez la rate ovariectomisée supplémentée en œstradiol et en progestérone (Sahu *et al.*, 1994). Les études immunohistochimiques montrent que les corps cellulaires des neurones à galanine sont nombreux dans les différents noyaux fortement impliqués dans le contrôle de la

sécrétion de LH tels que : le noyau préoptique médian, l'aire préoptique médiane, les noyaux préoptiques, périventriculaires et suprachiasmatiques, les noyaux hypothalamiques périventriculaires et paraventriculaires, et le noyau arqué (Merchenthaler *et al.*, 1993). Au niveau de l'aire préoptique, Merchenthaler *et al.* (1990) ont montré que certains neurones à galanine innervent les neurones à GnRH. L'importance physiologique de cet interrelation est renforcée par les études récentes de Mitchell *et al.* (1999) montrant qu'une certaine proportion de neurones à GnRH exprimait le récepteur à la galanine GALR1. Des études d'autoradiographies combinées à de l'immunohistochimie ont permis de montrer qu'une importante proportion des neurones à galanine localisés dans l'aire préoptique médiane et le noyau préoptique concentrait l'œstradiol (Bloch *et al.*, 1992). Il se pourrait donc qu'une partie de l'influence des œstrogènes sur l'activité des neurones à GnRH puisse être véhiculée par cette voie galaninergique. Par ailleurs, les neurones à galanine du noyau arqué sembleraient exprimer, eux aussi, le récepteur aux œstrogènes (Horvath *et al.*, 1995) ; or, très récemment Bouret *et al.* (1998) ont montré que les neurones à proopiomélanocortine (POMC) du noyau arqué, principal système peptidergique inhibiteur de l'activité gonadotrope, exprimaient les récepteurs à la galanine GALR1 et GALR2 ; ainsi les neurones à galanine du noyau arqué pourraient moduler de manière polysynaptique l'activité des neurones à GnRH en régulant l'activité des neurones à POMC qui se projettent dans l'aire préoptique.

Nous noterons que la galanine se retrouve dans de très nombreuses terminaisons nerveuses de la zone externe de l'éminence médiane. Les corps cellulaires des neurones galaninergiques se projetant dans l'éminence médiane sont localisés en majorité dans le noyau arqué, et en proportion moindre, dans l'aire préoptique et le noyau paraventriculaire (Merchenthaler, 1991). De nombreuses études sont à entreprendre afin de clarifier la nature et le mode d'action des voies galaninergiques impliquées dans l'initiation du pic préovulatoire de LH.

**Neurotensine.** La neurotensine est un neuropeptide qui agirait au voisinage des corps cellulaires à GnRH pour moduler l'amplitude du pic préovulatoire de LH. En effet l'injection de neurotensine dans l'aire préoptique accroît l'amplitude du pic de LH induit par les

stéroïdes (Ferris *et al.*, 1984 ; Akema *et al.*, 1987), alors que l'injection d'un immunosérum anti-neurotensine réduit l'amplitude de ce dernier (Alexander *et al.*, 1989). Par ailleurs, étant donné qu'aucun de ces traitements administrés soit par voie intraveineuse, soit directement sur des antéhypophyses *in vitro*, n'altère la sécrétion de LH, la neurotensine ne semblerait pas moduler l'activité des cellules gonadotropes (Rostène et Alexander, 1997). L'origine des fibres neurotensinergiques qui se projettent au niveau de l'aire préoptique reste inconnue, mais il est plausible qu'elles puissent provenir des nombreux corps cellulaires à neurotensine exprimant les récepteurs aux œstrogènes localisés dans l'AVPv (anteroventral periventricular nucleus) (Herbisson et Théodosis, 1992 ; Axelson *et al.*, 1992 ; Herbisson, 1998).

#### - Les peptides inhibiteurs

**Peptides opioïdes.** Parmi les neuropeptides inhibiteurs de l'hypothalamus, l'implication des peptides opioïdes endogènes est sûrement celle qui a été le plus étudiée (Kalra 1993). Les peptides opioïdes endogènes dérivent de trois précurseurs : POMC, pro-enképhaline et pro-dynorphine. La POMC renferme le peptide opioïde  $\beta$ -endorphine et les peptides non opioïdes ACTH et  $\alpha$ -MSH (Eipper et Mains, 1980 ; Smith et Funder, 1988). Les études neuroanatomiques montrent que les corps cellulaires des neurones immunoréactifs pour la  $\beta$ -endorphine sont localisés dans le noyau arqué (Bloom *et al.*, 1978 ; Finley *et al.*, 1981). Les cellules à POMC innervent de nombreuses régions du cerveau : ainsi dans le diencephale elles innervent, celles impliquées dans le contrôle de la sécrétion préovulatoire de GnRH comme le noyau arqué et l'aire préoptique (Simerly *et al.*, 1988 ; Meister, *et al.*, 1989 ; Bloom *et al.*, 1978 ; Finley *et al.*, 1981). Quelques fibres à POMC sont visibles dans la zone sous épendymaire de l'éminence médiane (Kiss *et al.*, 1985). Les deux pentapeptides, méthionine-enképhaline et leucine enképhaline, ont une distribution plus éparse dans l'hypothalamus. En effet des corps cellulaires immunoréactifs pour ces pentapeptides ont, entre autres, été localisés dans l'aire préoptique médiane, la région périfornicale, le noyau arqué, le noyau préoptique médian, les noyaux suprachiasmatique et périventriculaires (Simerly *et al.*, 1986, 1988 ; Simerly et Swanson, 1987). La méthionine-enképhaline et la leucine enképhaline sont issus du clivage de la proenképhaline, protéine contenant quatre copies de méthionine enképhaline et une copie de leucine enképhaline, (Imura *et al.*, 1985).

Le précurseur du troisième peptide opioïde endogène, la prodynorphine, comprend la dynorphine A (1-17), la dynorphine B, et les  $\alpha$ - et  $\beta$ -néoendorphines qui contiennent aussi dans leur séquence la leucine-enképhaline en position N-terminale (Imura *et al.*, 1985). Certains corps cellulaires de neurones à dynorphine sont localisés dans le noyau arqué et se projettent dans la zone interne de l'éminence médiane (Meister *et al.*, 1989). D'autres populations de neurones à dynorphine sont localisés dans l'aire préoptique et aussi dans les noyaux hypothalamique magnocellulaires, ces derniers innervant l'aire préoptique (Simerly *et al.*, 1986, 1988 ; Simerly et Swanson, 1987).

Il a été montré, chez la rate ovariectomisée, que les dynorphines étaient capables d'inhiber la sécrétion de LH en agissant par l'intermédiaire des récepteurs aux opioïdes  $\kappa$ , et que la méthionine enképhaline exerçait le même effet à travers les récepteurs  $\delta$  (Leadem et Kalra, 1985 ; Leadem et Yagenova, 1987). Des études immunohistochimiques entreprises à l'échelle de la microscopie photonique ont mis en évidence la présence de fibres enképhalinergiques et dynorphinergiques au voisinage des corps cellulaires et des terminaisons des neurones à GnRH chez le rat (Watson *et al.*, 1988). Cependant, aucune étude n'a jusqu'alors examiné l'implication des récepteurs aux opioïdes  $\delta$  et  $\kappa$  dans la régulation de la sécrétion de GnRH/LH par les œstrogènes (Kalra, 1993). A l'opposé de très nombreuses études se sont intéressées à l'implication de la  $\beta$ -endorphine et des récepteurs aux opioïdes  $\mu$  dans la régulation de l'activité du système à GnRH par les œstrogènes (Herbisson, 1998). La réalité d'une action transsynaptique directe de la  $\beta$ -endorphine sur les neurones à GnRH est appuyée par le fait qu'il existe des synapses à  $\beta$ -endorphine sur les dendrites et les soma des neurones à GnRH chez la rate (Chen *et al.*, 1990 ; Leranth *et al.*, 1988), et le singe (Thind et Goldsmith, 1988) et par le fait que les agonistes sélectifs des récepteurs  $\mu$  semblent avoir une action directe sur l'activité électrique des neurones à GnRH chez le cobaye (Lagrange *et al.*, 1995). Il a, par ailleurs, été observé que l'injection d'agonistes ou d'antagonistes des récepteurs  $\mu$  dans l'aire préoptique modifiait la libération de LH *in vivo* (Kalra, 1981). Cependant, l'impossibilité de détecter les ARNm des récepteurs aux opioïdes  $\mu$ ,  $\delta$  et  $\kappa$  dans les neurones à GnRH, alors que de nombreuses cellules voisines de l'aire préoptique les expriment (Sannella et Petersen, 1997 ; Mitchell *et al.*, 1997), remet en question l'existence d'une action directe des neurones à  $\beta$ -endorphine sur les neurones à

GnRH. Certains arguments semblent montrer que les cellules sécrétant la galanine (Mitchell *et al.*, 1997), le monoxyde d'azote (NO) (Pu *et al.*, 1997), la noradrénaline (Kalra, 1993 ; Bicknell, 1985) et les acides aminés excitateurs (Bonavera *et al.*, 1993) pourraient être les médiateurs des effets des peptides opioïdes sur la sécrétion de LH.

Contrairement à ce que nous pourrions penser, la rétroaction négative des œstrogènes sur la sécrétion de GnRH ne semblerait pas passer par la stimulation de l'activité des neurones à  $\beta$ -endorphine (Herbisson, 1998). En effet, les neurones à  $\beta$ -endorphine exerceraient un tonus inhibiteur continu sur le système à GnRH leur permettant de contrôler la pulsativité de la sécrétion de GnRH (Herbisson, 1998). Par contre, les neurones à  $\beta$ -endorphine seraient des médiateurs de la rétroaction positive des œstrogènes sur la sécrétion de GnRH : les œstrogènes entraîneraient une réduction de l'activité des neurones à  $\beta$ -endorphine et donc provoqueraient une levée du tonus inhibiteur exercé sur les neurones à GnRH. Ce processus permettrait la survenue du pic préovulatoire de LH (Kalra, 1993 ; Kerdelhue *et al.*, 1988 ; Herbison, 1998). Les œstrogènes entraîneraient ainsi une désinhibition du système à GnRH en diminuant l'expression des récepteurs à la  $\beta$ -endorphine (Weiland et Wise, 1990) et la sécrétion du neuropeptide (Kerdelhue *et al.*, 1988 ; Wilcox et Roberts, 1985 ; Wise *et al.*, 1990 ; Treiser et Wardlaw, 1992 ; Petersen *et al.*, 1993 ; Scarbrough *et al.*, 1994).

**Tachykinines.** Les tachykinines sont une famille de peptides biologiquement actifs qui possèdent une séquence N-terminale commune, Phe-x-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>, dans laquelle le résidu x est un acide aminé aliphatique ou aromatique. La substance P, la neurokinine A, le neuropeptide K et le neuropeptide- $\gamma$  dérivent de l'expression du gène de la préprotachykinine-I, alors que la tachykinine B et le peptide 2 dérivent de celle du gène de la préprotachykinine-II (Kalra, 1993).

Des corps cellulaires de neurones à substance P sont localisés dans le noyau arqué. Selon certains auteurs, ils se projetteraient dans la zone interne de l'éminence médiane ainsi que dans l'aire septo-préoptique, où des fibres à substance P établissent des contacts synaptiques avec les dendrites et les soma des neurones à GnRH (Tsuruo *et al.*, 1987 ; Tsuruo *et al.*, 1991 ). Quelques neurones à substance P sont, par ailleurs, regroupés au niveau

de la partie ventrolatérale de l'hypothalamus antérieur, du noyau périventriculaire, du noyau ventromédian hypothalamique et de l'aire préoptique médiane, et semblent innervent différentes régions hypothalamiques qui comportent les récepteurs à la substance P (Tsuruo *et al.*, 1984 ; Tsuruo *et al.*, 1987 ; Tsuruo *et al.*, 1991). Très peu d'études ont été entreprises pour déterminer l'influence de la substance P sur l'activité du système à GnRH. Kerdelhué *et al.* (1978) ont observés que l'injection d'un immunsérum anti-substance P en intraveineuse, à 12h le jour du proœstrus, avançait la survenue du pic préovulatoire de LH, alors que l'injection intracérébroventriculaire du même antiserum inhibait la survenue de ce pic.

Les effets de la substance P sur la sécrétion de LH sont donc ambigus, et les modes d'action de cette substance sur la sécrétion préovulatoire de GnRH sont méconnus. Le neuropeptide K serait, quant à lui, un puissant inhibiteur de la sécrétion de GnRH, et semblerait encore plus efficace que les opioïdes pour supprimer la sécrétion de LH induite par la progestérone chez les rates ovariectomisées supplémentée en œstradiol (Kalra, 1993).

#### *b- Les catécholamines*

**Dopamine.** Les neurones dopaminergiques innervant l'hypothalamus ont leurs corps cellulaires regroupés dans quatre régions du cerveau : les groupes de cellules A11, A12, A13 et A14 (Kordon *et al.*, 1994). Chez le rat, la dopamine est surtout connue pour réguler la sécrétion de prolactine au niveau de l'antéhypophyse, et son implication dans la régulation du système à GnRH reste difficile à interpréter. Chez le mouton, en revanche, la dopamine est connue pour être le principal médiateur de la rétroaction négative des œstrogènes sur la sécrétion de GnRH pendant la période d'œstrus (Herbison, 1998).

**Noradrénaline.** La noradrénaline semble exercer une influence permissive sur le système à GnRH en favorisant sa sécrétion (Herbison, 1997). Différentes études suggèrent que les neurones à noradrénaline du tronc cérébral pourraient être des médiateurs de la rétroaction positive des œstrogènes sur le système à GnRH (Herbison, 1998). En effet, dans l'aire préoptique et l'éminence médiane les concentrations en noradrénaline augmentent avant ou avec la survenue du pic de LH (Honnan et Wuttke, 1980 ; Demling *et al.*, 1985 ;

Rance *et al.*, 1981 ; Wise *et al.*, 1981 ; Mohankumar *et al.*, 1994). Par ailleurs, l'interruption de la voie noradrenergique (Clifton et Sawyer, 1979 ; Clifton et Sawyer, 1980) ou l'administration d'antagonistes du récepteur  $\alpha$ -adrenergique (Drouva *et al.*, 1982 ; Coen et Coombs, 1983) ont pour effet aigu de bloquer la survenue du pic de LH. Cependant, les études de Clifton et Sawyer (1979, 1980) montrent qu'après lésion du système noradrenergique, les mécanismes conduisant à la survenue du pic de LH redeviennent fonctionnels quelques semaines plus tard. Ces faits expérimentaux suggèrent que dans le fonctionnement du système à GnRH, la noradrénaline ne serait pas un neurotransmetteur excitateur indispensable mais plutôt un facteur permissif jouant cependant un rôle important dans la physiologie de la reproduction (Herbison, 1997).

Très récemment Hosny et Jennes (1998) ont montré que 80% des neurones à GnRH exprimaient le récepteur  $\alpha_1$ -adrénergique, et que l'immunoréactivité pour ce récepteur était surtout observée au niveau des corps cellulaires. Wright et Jennes (1993) ont montré que les fibres noradrénergiques qui se projetaient au voisinage des neurones à GnRH dans l'aire préoptique provenaient du tronc cérébral et plus précisément des groupes A1 et A2. Herbison (1997) a, quant à lui, montré que seuls les neurones A2 se projetant à proximité des corps cellulaires des neurones à GnRH exprimaient le récepteur aux œstrogènes. L'induction par les œstrogènes d'une sécrétion accrue de noradrénaline le jour du proœstrus semble agir à la fois sur la biosynthèse et sur la libération de la GnRH. Au niveau de l'aire préoptique, la noradrénaline semblerait moduler l'expression de l'ARNm de la GnRH. En effet, Weesner *et al.* (1993) ont montré que l'augmentation des taux d'ARNm de la GnRH induite par les œstrogènes était bloquée par un antagoniste du récepteur  $\alpha_1$ -adrenergique. Par ailleurs, He *et al.* (1993) ont montré que l'injection intracérébroventriculaire de noradrénaline induisait, dans l'heure suivante, une augmentation des taux d'ARNm de la GnRH / cellule. Par ailleurs, au niveau de l'éminence médiane, des travaux réalisés chez le mâle suggèrent que la noradrénaline stimule la libération de GnRH en induisant la synthèse de monoxyde d'azote et de prostaglandines  $E_2$  (Ojeda *et al.*, 1979, 1982 ; Rettori *et al.*, 1992).

### *c- Les acides aminés excitateurs*



Les acides aminés *glutamate* et *aspartate* sont d'importants neurotransmetteurs excitateurs de l'hypothalamus neuroendocrine (Van Den Pol *et al.*, 1990) qui exercent une puissante action stimulatrice sur la sécrétion de GnRH (Brann et Mahesh, 1997). Les études utilisant des bloqueurs pharmacologiques des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), DL- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique acid (AMPA), et kaïnate, ont montré que le glutamate et l'aspartate jouaient un rôle dans la régulation du mode de sécrétion pulsatile (Ping *et al.*, 1994) et cyclique (Lopez *et al.*, 1990 ; Brann et Manesh, 1991) de GnRH/LH chez la rate adulte. Le site d'action privilégié des acides aminés excitateurs semble être l'hypothalamus, car l'injection directe de glutamate au niveau de l'hypophyse antérieure est sans effet sur la sécrétion de LH (Ondo *et al.*, 1976).

Il est intéressant de noter que le glutamate et/ou l'aspartate n'ont pas les mêmes effets sur la sécrétion de GnRH/LH selon qu'ils agissent sur des récepteurs NMDA ou non-NMDA tels que les récepteurs AMPA/kaïnate. En effet, le NMDA est capable d'induire une sécrétion répétée de LH lorsqu'il est administré sur un mode pulsatile, alors que le kaïnate en est incapable (Medhamurthy *et al.*, 1992 ; Abbud et Smith, 1991). Une première injection unique de kaïnate entraîne une forte libération de LH, alors que des injections répétées sont sans effet sur la sécrétion de LH (Medhamurthy *et al.*, 1992 ; Abbud et Smith, 1991). Par contre, les doses d'AMPA ou de kaïnate nécessaires pour stimuler la libération de LH sont beaucoup plus faibles que celles de NMDA (Brann, 1995). Le site d'action majeur du NMDA serait l'aire préoptique/OVLT (Bourguignon *et al.*, 1989 ; Bourguignon *et al.*, 1989), où sont localisés les corps cellulaires des neurones à GnRH, alors que le site majeur de l'action du kaïnate serait la région de l'hypothalamus médiobasal (Donoso *et al.*, 1990 ; Lopez *et al.*, 1992), où sont localisées les terminaisons nerveuses à GnRH.

La question est désormais de savoir si les acides aminés excitateurs agissent sur les neurones à GnRH directement, ou par l'intermédiaire d'interneurones. Les études d'hybridation *in situ* montrent que, parmi les neurones à GnRH, 5 % expriment l'ARNm du récepteur NMDA-R1 chez les rats mâles et femelles (Abbud et Smith, 1995 ; Eyigor et Jennes, 1996), 17 % expriment l'ARNm du récepteur NMDA-R2 et 32 % celui du récepteur au kaïnate, KA<sub>2</sub> (Eyigor et Jennes, 1997). Par ailleurs, selon les travaux de Lee *et al.* (1993) et de Saitoh *et al.* (1991), le NMDA induit l'expression de c-Fos dans les

cellules voisines des neurones à GnRH mais pas dans les neurones à GnRH eux mêmes. Ces études semblent donc montrer que l'effet du NMDA sur les neurones à GnRH au niveau de l'aire préoptique/OVLT ne serait directe que sur une minorité de cellules, et passerait par l'intermédiaire d'interneurones pour la majorité d'entre elles. La nature des interneurones, jouant le rôle de médiateur des effets du glutamate sur les neurones à GnRH, reste à déterminer. Quelques éléments bibliographiques permettent de penser que les neurones noradrenergiques pourraient être impliqués dans ce processus de médiation (Liaw et Barraclough, 1993 ; MacDonald, Wilkinson, 1992). Cependant, les neurones les plus impliqués dans ce processus semblent être les neurones synthétisant le monoxyde d'azote (NO) ; en effet, Bhat *et al.* (1995) ont montré que les neurones exprimant la monoxyde d'azote synthétase neuronale (nNOS) coexprimaient le récepteur NMDA-R1. Par ailleurs, l'administration *in vivo* d'inhibiteurs de la NOS bloque la survenue du pic de LH induite par le NMDA (Brann et Manhesh, 1997).

#### *d- Le GABA*

L'acide  $\gamma$ -aminobutyrique, ou GABA, semble jouer un rôle majeur au sein du système à GnRH (Herbison, 1998). Des terminaisons GABAergiques réalisent des synapses avec les neurones à GnRH (Leranth *et al.*, 1985). Les neurones à GnRH expriment les sous unités des récepteurs GABA<sub>A</sub> (Jung *et al.*, 1998) ; la microinjection de GABA au voisinage des cellules à GnRH *in vivo* entraîne une importante inhibition de l'activité sécrétoire de ces neurones chez différentes espèces (Jarry *et al.*, 1991 ; Herbison *et al.*, 1991 ; Scott et Clarke, 1993 ; Mitsushima *et al.*, 1994). Par ailleurs, le GABA pourrait moduler l'expression de l'ARNm de la GnRH chez la rate (Bergen *et al.*, 1991 ; Kang *et al.*, 1995 ; Leonhardt *et al.*, 1995). Le système GABAergique de l'aire préoptique semble être très sensible aux taux d'œstrogènes circulants (Herbison, 1997b). De plus, les neurones à GABA de l'aire préoptique expriment le récepteur aux œstrogènes (Flugge *et al.*, 1986 ; Herbison *et al.*, 1993). Il a aussi été montré que la sécrétion, la recapture de GABA (Ondo *et al.*, 1982 ; Mansky *et al.*, 1982 ; Herbison *et al.*, 1991), et la synthèse du récepteur GABA<sub>A</sub> (Herbison et Fenelon, 1995) étaient fortement influencées par les œstrogènes dans l'aire préoptique.

Ainsi, comme le suggère Herbisson (1998), les neurones GABAergiques sensibles aux œstrogènes pourraient jouer, dans le système à GnRH, le rôle de médiateur de la rétroaction négative des œstrogènes sur les neurones à GnRH. Il existe en effet une relation inverse entre les taux de GABA dans l'aire préoptique et les taux de la LH circulante chez le rat. Lorsque l'œstradiol exerce son action inhibitrice sur la sécrétion de LH, les taux de GABA dans l'aire préoptique sont élevés (Mansky *et al.*, 1982 ; Herbison *et al.*, 1991), alors que chez la rate ovariectomisée, comportant des taux de LH élevés, la sécrétion de GABA dans l'aire préoptique est faible (Ondo *et al.*, 1982). De plus, l'inhibition des récepteurs GABA<sub>A</sub> entraîne une élévation des taux de LH pendant la phase où les œstrogènes exercent leur rétroaction négative (Akema *et al.*, 1990).

Le GABA est non seulement impliqué dans la médiation de la rétroaction négative des œstrogènes sur le système à GnRH, mais pourrait également être impliqué de manière indirecte dans la modulation de la sécrétion pulsatile de la GnRH en régulant le tonus inhibiteur exercé sur les neurones à GnRH par les neurones à  $\beta$ -endorphine du noyau arqué (Blasquez *et al.*, 1994 ; Horvath *et al.*, 1992). Ainsi, le GABA pourrait avoir un effet stimulateur sur la sécrétion de GnRH par voie polysynaptique, par une désinhibition du système (Kalra *et al.*, 1997).

#### *e- Les neurones synthétisant le monoxyde d'azote (NO)*

L'identification du NO en tant que messenger neuronal est récente (Bredt, *et al.*, 1990). Depuis, le NO a été impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions du système nerveux (Dawson et Snyder, 1994). Dans le cerveau, le NO est synthétisé à partir de L-arginine par la monoxyde d'azote synthétase neuronale (nNOS), isoforme de NOS exprimée de manière constitutive dans différentes populations neuronales (Schuman et Madisson, 1994). Les populations neuronales du cerveau présentant les plus hauts niveaux d'expression de la nNOS semblent être localisées dans l'hypothalamus (Schuman et Madisson, 1994 ; Bredt *et al.*, 1991) ; différentes études ont impliqué le NO dans la régulation neuroendocrinienne de la sécrétion d'hormones hypophysaires (Grossman, 1994).

Des études *in vivo* et *in vitro*, utilisant des inhibiteurs de la NOS, ont montré que la synthèse et la libération de NO par l'hypothalamus étaient indispensables pour la sécrétion

basale de la LH chez le mâle (Rettori *et al.*, 1993) et pour la survenue du pic de LH chez les rates ovariectomisées et supplémentées en œstradiol et en progestérone (Bonavera *et al.*, 1993, 1994). De manière remarquable, l'utilisation de molécules donneuses de NO permet d'induire le pic de LH chez des rates ovariectomisées supplémentées en l'œstradiol (Bonavera *et al.*, 1996), montrant que le NO aurait un effet analogue à celui de la progestérone. Le rôle crucial que jouerait le NO dans le déclenchement du pic préovulatoire de LH est renforcé par le fait que l'injection intracérébroventriculaire d'antisens de la NOS, pour inhiber l'expression de l'enzyme dans l'hypothalamus, inhibe la survenue du pic de LH induit par l'œstradiol et la progestérone chez la rate ovariectomisée (Aguan *et al.*, 1996). Des études très récentes montrent que l'œstradiol stimule l'expression de la nNOS dans l'aire préoptique, et exerce ainsi une action facilitatrice sur les neurones produisant du NO, et semble moduler, de cette manière, l'activité des neurones à GnRH (Pu *et al.*, 1998). Toutes ces études montrent que le NO est fortement impliqué dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH. Les neurones à GnRH n'expriment pas la nNOS mais, ceux situés dans l'aire préoptique rostrale sont entourés de nombreuses cellules exprimant la nNOS (Herbison *et al.*, 1996). Il est intéressant de noter qu'au niveau de l'éminence médiane, les fibres à nNOS et les fibres à GnRH sont distribuées très différemment : zone interne et zone externe, respectivement (Herbison *et al.*, 1996). Par ailleurs, il existe une forte immunoréactivité pour la NOS dans l'endothélium des capillaires portes hypophysaires (Ceccatelli *et al.*, 1992 ; Yamada et Hokfelt, 1996).

Les effets de la sécrétion de NO au niveau de l'aire préoptique sur l'activité des neurones à GnRH sont totalement inconnus. Seule une étude de Belsham *et al.* (1996), réalisée sur la lignée cellulaire hypothalamique GT1, sécrétant du GnRH, semble indiquer que le NO pourrait réprimer la transcription du gène de la GnRH.

Au niveau de l'éminence médiane, le NO stimulerait directement l'exocytose des granules neurosécrétoires contenant la GnRH par deux voies possibles : la première serait une voie de transduction passant par la production de GMPC (Bonavera *et al.*, 1993 ; Pu *et al.*, 1996 ; Moretto *et al.*, 1993) et l'activation de conductances cationiques (Fesenko *et al.*, 1985) conduisant à une dépolarisation de la membrane et à la libération de GnRH (Drouva *et al.*, 1984) ; la deuxième passerait par l'activation de la cyclooxygénase et la production de prostaglandines par les terminaisons à GnRH et/ou les cellules gliales (Rettori *et al.*, 1992).

Les prostaglandines produites entraîneraient la mobilisation des stocks intracellulaires de calcium (Ojeda et Negro-Vilar, 1985) et la production d'AMPc (Ojeda *et al.*, 1985) ce qui conduirait à l'exocytose des granules de sécrétion contenant la GnRH (Rettori *et al.*, 1992). Cette dernière hypothèse est renforcée par le fait que les neurones à GnRH expriment le récepteur aux prostaglandines (Rage *et al.*, 1997).

### **Interactions neuro-gliales et système à GnRH**

Depuis plusieurs années, l'implication des cellules gliales dans la régulation du système à GnRH semble être de plus en plus évidente (Ojeda, 1994). En effet différentes études ont apporté la preuve que l'activité des neurones à GnRH était non seulement modulée par de nombreux facteurs neuronaux, mais aussi par des substances d'origine gliale, tels que des facteurs de croissance (Ojeda *et al.*, 1990 ; Gallo *et al.*, 1995 ; Melcangi *et al.*, 1995 ; Voigt *et al.*, 1996 ; Ma *et al.*, 1997) et les prostaglandines (Rage *et al.*, 1997). De nombreuses études révèlent, par ailleurs, que les cellules gliales pourraient être des médiateurs non négligeables de l'action des œstrogènes sur l'axe reproducteur au niveau hypothalamique (Garcia-Segura *et al.*, 1994 ; Herbison, 1998). Les œstrogènes pourraient, en effet, être les moteurs d'une plasticité neurogliale permettant de moduler la connectivité des neurones appartenant au système à GnRH et donc, par là même, réguler leur activité (Theodosis et Poulain, 1993 ; Garcia-Segura *et al.*, 1994 ; Herbison, 1998). Du fait que des astrocytes et des épendymocytes de l'hypothalamus expriment le récepteur aux œstrogènes (Langub et Watson, 1992), l'induction de phénomènes de plasticité par les œstrogènes pourrait passer, en partie, par une action directe sur les cellules gliales.

#### **a- Facteurs de croissance gliaux**

Il est désormais clair que les astrocytes hypothalamiques utilisent des substances trophiques de nature peptidergique pour agir sur le développement et l'activité sécrétoire des neurones à GnRH. Les facteurs de croissance gliaux connus pour affecter la fonction des neurones à GnRH sont : le TGF $\alpha$  (Transforming growth factor) (Ojeda *et al.*, 1990), le bFGF

(basic fibroblast growth factor) (Voigt *et al.*, 1996 ; Tsai *et al.*, 1995), et le TGF $\beta$ 1 (Melcangi *et al.*, 1995 ; Galbiati *et al.*, 1996). Le TGF $\alpha$  est le polypeptide astrocytaire (Ma *et al.*, 1992, 1994) dont l'action sur le système à GnRH est la mieux caractérisée grâce aux travaux de l'équipe d'Ojeda. Ainsi le TGF $\alpha$  stimule la libération de GnRH à partir de fragments d'éminence médiane maintenus en survie (Ojeda *et al.*, 1990) mais est aussi un des facteurs déclencheurs de la puberté chez la rate (Ma *et al.*, 1992 ; Junier *et al.*, 1991). Le fait que les neurones à GnRH n'exprimaient pas le récepteur à l'EGF (epidermal growth factor) (Ma *et al.*, 1994 ; Voigt *et al.*, 1996), récepteur capable de transduire le message du TGF $\alpha$ , a conduit Ojeda et ses collègues à émettre l'hypothèse selon laquelle le TGF $\alpha$  agirait sur un type cellulaire intermédiaire pour induire la sécrétion de GnRH. A l'aide de l'utilisation de neurones GT1 et de co-cultures neurones GT1 / astrocytes, Ma *et al.* (1997) démontrent que le TGF $\alpha$  nécessite la présence d'astrocytes pour stimuler la sécrétion de GnRH, et que cet effet passe via la synthèse de prostaglandines E<sub>2</sub> par ces astrocytes (Ma *et al.*, 1997). La réalité physiologique d'un tel mode d'action du TGF $\alpha$  est renforcée par le fait que les neurones à GnRH expriment le récepteur aux prostaglandines E<sub>2</sub> (Rage *et al.*, 1997).

Le bFGF est un autre facteur de croissance glial récemment impliqué dans la modulation de la fonction des neurones à GnRH (Voigt *et al.*, 1996 ; Tsai *et al.*, 1995). Outre que ce facteur faciliterait la différenciation et la survie des neurones à GnRH (Voigt *et al.*, 1996 ; Tsai *et al.*, 1995), il stimulerait la maturation de la prohormone GnRH (Voigt *et al.*, 1996 ; Wetsel *et al.*, 1996).

Melcangi *et al.* (1995) montrent que le milieu de culture conditionné par des astrocytes immatures, contient un facteur thermostable capable d'induire la sécrétion de GnRH par les neurones GT1 en culture. Le facteur identifié responsable d'une telle action est le TGF $\beta$ . La même équipe montre que le TGF $\beta$ , en plus de stimuler la libération de GnRH par les neurones GT1, est capable de moduler l'expression du gène de la GnRH (Galbiati *et al.*, 1996). En effet, une courte exposition des neurones GT1 au TGF $\beta$  (1 à 6 h) augmente les taux d'ARNm cellulaires de la GnRH, alors qu'une exposition prolongée au TGF $\beta$  (24 h) semble inhiber l'expression de la GnRH (Galbiati *et al.*, 1996). Le TGF $\beta$ , contrairement au TGF $\alpha$  semblerait agir directement sur le neurone à GnRH.

Nous noterons que, parallèlement à ces régulations exercées par des facteurs de croissance d'origine gliale sur l'activité des neurones à GnRH, les neurones à GnRH eux-mêmes sont capables de réguler l'activité de prolifération de la glie par la sécrétion de facteurs non encore pleinement caractérisés (Gallo *et al.*, 1995), suggérant l'existence d'une communication bi-directionnelle complexe entre les neurones à GnRH et les cellules gliales véhiculée par des molécules de signalisation intercellulaire variées de nature encore inconnue pour certaines.

#### b- Plasticité neurogliale

L'observation, à l'échelle ultrastructurale, des neurones à GnRH a permis d'établir, dans différentes espèces, que le nombre de leurs afférences variait de manière réversible en fonction de l'imprégnation en stéroïdes gonadiques, et que ce phénomène pouvait être lié à une variation de la surface d'apposition neuro-gliale. Ainsi, Witkin *et al.* (1991) montrent que l'ovariectomie entraîne, chez le singe rhésus, une augmentation significative du recouvrement des corps cellulaires de neurones immunoréactifs pour la GnRH par des prolongements astrocytaires, associée à une baisse du nombre de synapses observée à leur surface. De tels changements ne sont pas observés lorsque les animaux sont traités par les œstrogènes. Par ailleurs, des phénomènes analogues peuvent être observés chez les animaux saisonniers. Chez le mouton en ancestrus, les neurones à GnRH sont pratiquement entièrement recouverts de prolongements gliaux, et le nombre de synapses alors dénombré est significativement plus faible que celui observé chez les animaux en période de reproduction (Lehman *et al.*, 1988).

Dans certaines conditions physiologiques, la variation du recouvrement glial des corps cellulaires à GnRH peut ne pas être associée à une variation du nombre d'afférences et inversement. En effet, lors de la puberté chez la femelle rhésus, il y a une baisse du recouvrement glial des neurones à GnRH sans augmentation de leur connectivité (Witkin *et al.* 1995,1997). Par contre, lors de la puberté du singe rhésus mâle, la connectivité des neurones à GnRH chute alors qu'il n'y a pas de variation du taux de recouvrement glial (Perera et Plant, 1997).

Contrairement à ce qui est observé chez le singe et le mouton, aucun phénomène de plasticité neurogliale induit par les stéroïdes gonadiques n'a pu être mis en évidence chez le rat, au niveau des corps cellulaires des neurones à GnRH (Romero *et al.*, 1994). Seule une augmentation du nombre de synapses axo-somatiques sur les neurones à GnRH a été observée chez le rat mâle lors du vieillissement (Witkin, 1992 ; Romero *et al.*, 1994). Chez le rat, l'œstradiol peut cependant induire une plasticité neurogliale dans le noyau arqué (Garcia-Segura *et al.*, 1994), noyau très impliqué dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH comme nous l'avons énoncé dans les paragraphes précédents. En effet, l'équipe de Garcia-Segura a montré que les œstrogènes induisaient, le jour du proœstrus, le retrait des afférences GABAergiques des corps cellulaires du noyau arqué, conduisant à une augmentation de l'activité des neurones de cette région (Garcia-Segura *et al.*, 1994 ; Yeoman et Jenkins, 1989). De tels phénomènes de plasticité, qui se déroulent sur une période de 48 h, entre le diœstrus et l'œstrus, pour un cycle complet de désafférentation et réafférentation (Olmos *et al.*, 1989), pourraient être induits par un facteur de croissance périphérique, l'IGF-1 (insulin growth factor), dont la capture par les tanocytes dans la circulation porte et la diffusion au niveau du noyau arqué semble être dépendante des taux d'œstrogènes circulants (Fernandez-Galaz *et al.*, 1997). Nous noterons que l'IGF-1 est, par ailleurs, un facteur connu pour moduler la sécrétion de GnRH par les terminaisons neuroendocrines de l'éminence médiane (Hiney *et al.*, 1991 ; Bourguignon *et al.*, 1993).

## **II. Généralités sur l'éminence médiane**

### **II.1. Anatomie de l'éminence médiane**

L'éminence médiane matérialise l'interface entre l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure. Cette structure hypothalamique résulte de la différenciation du plancher du



troisième ventricule, et constitue le site de projection des différents systèmes préhypophysiotropes. Cette région est également caractérisée par la présence d'un système de capillaires constituant le plexus porte hypophysaire. Les différents facteurs préhypophysiotropes sont sécrétés dans les vaisseaux du plexus porte hypophysaire, à partir de terminaisons neuroendocrines localisées dans la zone externe de l'éminence médiane.

La zone externe de l'éminence médiane est essentiellement constituée de terminaisons nerveuses et de prolongements tanycytaires. Les tanocytes sont des épendymocytes dont les corps cellulaires bordent le troisième ventricule et comportent des prolongements qui peuvent atteindre les capillaires du plexus porte hypophysaire, ce qui donne un aspect palissadique à la zone externe de l'éminence médiane. Ces épendymocytes non ciliés sont joints entre eux par des jonction serrées empêchant ainsi toute communication entre les capillaires portes et le troisième ventricule par l'intermédiaire des espaces intercellulaires (Brightman et Reese, 1969). Les capillaires du plexus porte primaire sont dépourvus de limitante névroglie, ou barrière hématoencéphalique. L'endothélium présente en outre une paroi fenêtrée (Barry, 1967). Les capillaires sont entourés par un espace péricapillaire compris entre une basale parenchymateuse, bordant le tissu nerveux, et une basale sous-endothéliale, bordant l'endothélium des capillaires (Barry, 1967). L'espace péricapillaire renferme des fibrilles réticulées ou collagènes et des péricytes.

Généralement, il est admis que les terminaisons nerveuses des différents systèmes préhypophysiotropes contactent la lame basale parenchymateuse pour réaliser l'exocytose de leurs granules de sécrétion (Rinne, 1966 ; Moneroe, 1967 ; Stoeckart *et al.*, 1972). Elles libèrent ainsi leurs neurohormones dans le sang porte hypophysaire (Liposits *et al.*, 1983; Hisano *et al.*, 1986; Ibata *et al.*, 1986; Beauvillain *et al.*, 1984; Jew *et al.*, 1984; Bouchaud and Bosler, 1986).

## **II.2. Distribution des fibres et des terminaisons du système à GnRH**

Les systèmes hypophysiotropes se terminent, comme il a été énoncé ci-dessus, dans la couche palissadique de la zone externe de l'éminence médiane. La localisation précise des terminaisons et des fibres contenant les différentes neurohormones a pu être déterminée grâce

à l'utilisation de techniques immunocytochimiques. Dans l'éminence médiane, qui s'étend chez le rat sur plus de 2,5 mm, chaque système neurohormonal possède une distribution qui lui est propre (Hokfelt *et al.*, 1978).

En ce qui concerne le système à GnRH, l'immunoréactivité des fibres à GnRH est visualisée sur toute l'étendue antéro-postérieure de l'éminence médiane. Lors d'une progression antéropostérieure, les premières fibres à GnRH apparaissent dès la fin de l'aire rétrochiasmatisque ; le faisceau de fibres réparti sur toute l'étendue de la zone externe de l'éminence médiane s'intensifie à mesure que l'on progresse caudalement. Lorsque postérieurement, l'étranglement dorso-latéral de l'éminence médiane apparaît, le faisceau de fibres se sépare en deux : les fibres à GnRH se regroupent de manière symétrique au niveau de l'éminence médiane dorso-latérale, et très peu de fibres sont alors observées dans l'éminence médiane ventrale. Plus postérieurement, l'étranglement dorso-latéral de l'éminence médiane s'accroît de plus en plus, jusqu'à entraîner la fusion des deux parties dorsales de l'éminence médiane. Le marquage est alors localisé dans la partie dorsale de l'éminence médiane. Finalement, lorsque la tige hypophysaire s'individualise et se sépare de la base de l'hypothalamus, tout en y étant rattaché par les capillaires du plexus porte hypophysaire, le marquage de la GnRH visualisé à la base de l'hypothalamus devient particulièrement intense alors que peu de fibres immunoréactives sont observées dans la tige hypophysaire. Lorsque la tige hypophysaire se détache de l'hypothalamus, l'immunoréactivité pour la GnRH à la base du cerveau décroît très rapidement, avant de disparaître définitivement.

A l'échelle ultrastructurale, les fibres et les terminaisons à GnRH sont observées dans la zone externe de l'éminence médiane à proximité de l'espace péricapillaire, mais ne sont pas observées, contrairement aux terminaisons des autres systèmes hypophysiotropes (Liposits *et al.*, 1983; Hisano *et al.*, 1986; Ibata *et al.*, 1986; Beauvillain *et al.*, 1984; Jew *et al.*, 1984; Bouchaud and Bosler, 1986), au contact direct de la membrane basale parenchymateuse (Koslowky and Coates, 1985 ; Ugrumov *et al.*, 1989 ; King et Letourneau, 1994). En effet, les terminaisons à GnRH sont séparées de l'espace péricapillaire par des prolongements tancytaires (Koslowky and Coates, 1985 ; Ugrumov *et al.*, 1989 ; King et Letourneau, 1994), et cet arrangement semble être tout à fait particulier au système à GnRH (Ugrumov *et al.*, 1989).

### II.3. Mise en évidence de régulations paracrines et/ou autocrines dans la zone externe de l'éminence médiane

L'hypothèse de l'existence d'interrelations entre les structures nerveuses au sein de l'éminence médiane est apparue dès la mise en évidence des catécholamines par la technique de Falk *et al.* (1962). Le fait, par ailleurs, que les structures synaptiques étaient absentes de cette région a conduit à imaginer des actions de type paracrine et/ou autocrine entre les différentes structures, avant même que les neuropeptides préhypophysiotropes aient été caractérisés. A la fin des années 70, des études réalisées à partir d'explants d'éminence médiane maintenus en survie ont permis de confirmer que de nombreuses régulations pouvaient s'opérer à ce niveau (Rotsztein *et al.*, 1976 ; Rotsztein *et al.*, 1978 ; Ojeda *et al.*, 1982, Negro-Vilar, 1982).

Les notions de paracrinie et d'autocrinie ont pris toute leur importance lorsque l'utilisation de techniques immunocytochimiques a permis de démontrer la coexistence de neuropeptides de nature différente dans les mêmes terminaisons nerveuses de la zone externe de l'éminence médiane, et parfois, dans les mêmes granules de sécrétion (Tramu *et al.*, 1981, 1984a ; Beauvillain *et al.*, 1984). L'observation de tels phénomènes a permis d'établir que certains facteurs étaient co-libérés dans la circulation porte hypophysaire et donc, pouvaient avoir une action synergique sur leurs cellules cibles dans l'anté-hypophyse, comme le CRF et la vasopressine (Tramu *et al.*, 1984b ; Gillies *et al.*, 1982) ; ceci a également permis d'établir que des régulations autocrines et/ou paracrines pouvaient s'opérer dans la zone externe de l'éminence médiane. De telles régulations paracrines et/ou autocrines ont été suggérées entre l'enképhaline et la somatostatine (Tramu *et al.*, 1981, 1984a ; Beauvillain *et al.*, 1984), et plus tard, par d'autres auteurs entre l'enképhaline et le CRF (Merchenthaler *et al.*, 1986), puis l'enképhaline et la dopamine (Meister *et al.*, 1989).

Cette notion impliquait l'existence de récepteurs au niveau des terminaisons nerveuses de la zone externe de l'éminence médiane pour les différents facteurs caractérisés. Des études de localisation de sites de liaisons réalisées par autoradiographie *in vitro*, à l'échelle de la microscopie photonique, ont permis de montrer l'existence de récepteurs pour

différentes substances contenues dans les terminaisons nerveuses de la zone externe de l'éminence médiane (Sarkar *et al.*, 1983 ; Anderson et Mitchell, 1986 ; Melander *et al.*, 1987 ; Lagny-Pourmir *et al.*, 1992). Les travaux de l'équipe de Beauvillain apporteront plus tard la preuve directe de l'existence de modulations paracrines et/ou autocrines dans la zone externe de l'éminence médiane par la mise en évidence, à l'échelle ultrastructurale, de récepteurs ou d'endopeptidases sur les membranes des terminaisons nerveuses et les éléments tanycytaires de cette région (Beauvillain *et al.*, 1992 ; Dutriez *et al.*, 1997 ; Vandembulke *et al.*, 1993 ; Vandembulke *et al.*, 1994).

#### II.4. Régulations de la libération de GnRH au niveau de l'éminence médiane

L'étude de la sécrétion de la GnRH *in vitro*, à partir de fragments de tissus maintenus en survie, a permis de mieux connaître l'implication des différentes régions constituant le système à GnRH dans le contrôle de cette sécrétion, et de comprendre plus précisément les régulations qui pouvaient s'opérer directement au niveau des terminaisons à GnRH, dans la zone externe de l'éminence médiane. Les études réalisées sur des fragments d'hypothalamus médiobasal (HMB) ou d'éminence médiane (EM) montrent, de manière frappante, que les terminaisons nerveuses à GnRH coupées de leur corps cellulaire restent fonctionnelles pendant de nombreuses heures, et qu'elles peuvent même parfois adopter un mode de sécrétion pulsatile pour la GnRH.

##### **Mode de sécrétion *in vitro* de la GnRH**

**Sécrétion basale de GnRH.** Les premières études entreprises sur la libération de la GnRH par les terminaisons nerveuses de l'éminence médiane, montrent que la sécrétion de GnRH par des synptosomes ou des fragments d'HMB peut être induite par une dépolarisation provoquée par l'addition, dans le milieu, de fortes concentrations de potassium (Rotsztein *et al.*, 1976 ; Warberg *et al.*, 1977). Ojeda *et al.* (1979) montrent que la sécrétion basale de GnRH au niveau de fragments d'HMB ou d'EM, est sous la dépendance de la sécrétion de prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) par ces mêmes fragments. Ceci précise l'observation

réalisée par Eskay *et al.* (1975), selon laquelle les PGE<sub>2</sub> stimulaient la sécrétion de GnRH dans le sang porte hypophysaire. En outre, les taux de sécrétion de PGE<sub>2</sub> sont cinq fois plus importants pour les fragments d'EM seuls que pour les fragments d'EM associés au noyau arqué : les neurones du noyau arqué auraient donc un effet inhibiteur sur la production de prostaglandine par l'éminence médiane. Cette observation pourrait expliquer le fait que la sécrétion basale de GnRH soit dix fois plus importante pour les fragments d'EM que pour les fragments d'EM associés au noyau arqué (Negro-Vilar *et al.*, 1979). De plus, Linton *et al.* (1979) montrent que le traitement des animaux par un inhibiteur de la synthèse des prostaglandines, l'indométhacine, entraîne une baisse de la sécrétion basale de GnRH par des synaptosomes et confirme ainsi l'action stimulatrice des PGE<sub>2</sub> sur la libération de GnRH. Cependant, l'indométhacine n'a aucun effet sur la libération de GnRH lorsqu'elle est ajoutée dans le milieu d'incubation contenant des synaptosomes isolés à partir d'animaux non traités. Cette observation indique que les prostaglandines ne seraient pas synthétisées par les synaptosomes, et donc pas par les terminaisons nerveuses de l'EM. D'après les travaux de l'équipe d'Ojeda, la principale source de prostaglandines dans l'EM pourrait être les tanocytes (Ojeda *et al.*, 1990), et de plus les PGE<sub>2</sub> pourraient agir directement sur les terminaisons à GnRH puisque ces neurones expriment le récepteur aux PGE<sub>2</sub> (Rage *et al.*, 1997). Les PGE<sub>2</sub> semblent induire l'exocytose des granules de sécrétion contenant la GnRH selon deux voies : la première, qui serait la voie prédominante, entraîne une mobilisation du calcium intracellulaire provenant du réticulum endoplasmique et une libération de GnRH sans implication de la calmoduline (Ojeda et Negro-Vilar, 1985 ; Ojeda *et al.*, 1988) ; la deuxième implique la synthèse d'AMPC par un mécanisme dépendant de la calmoduline, entraînant l'activation de protéines kinases AMPC-dépendantes qui vont phosphoryler les canaux calciques voltage-dépendants membranaires, provoquant alors une entrée d'ion calciques dans la terminaison puis à l'exocytose des granules de sécrétions (Ojeda *et al.*, 1985, 1988). Par ailleurs, les études de Drouva *et al.* (1981, 1984) montrent que la sécrétion de GnRH induite par une dépolarisation, implique la mobilisation du calcium intracellulaire par l'intermédiaire de l'activation de canaux calciques voltage-dépendants. Les ions calciques ainsi libérés activeraient le système des protéines kinases calcium-calmoduline dépendantes.

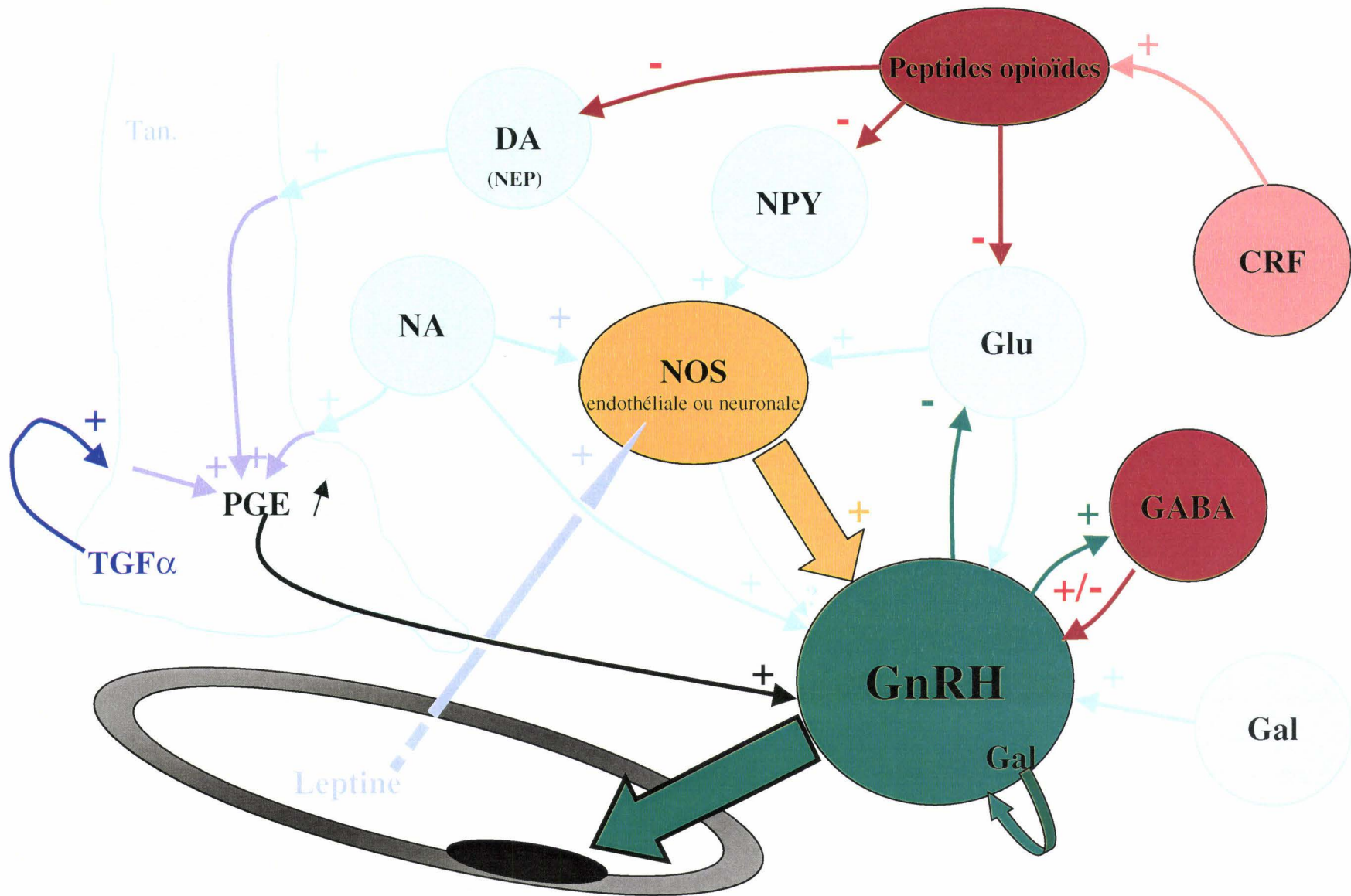
Bourguignon et Franchimont (1981, 1984) mettent en évidence que la sécrétion de GnRH par les fragments d'HMB est pulsatile. En 1993, Rasmussen montre que les fragments d'EM, sans noyau arqué, possèdent, eux aussi, une pulsativité propre et que celle-ci est inhibée par la déplétion des stocks intracellulaires de calcium. Ultérieurement, Purnelle *et al.* (1997) confirment l'existence d'une pulsativité de la sécrétion de GnRH par des fragments d'HMB, mais ne retrouvent pas un tel mode de sécrétion pour des fragments d'EM. Quoiqu'il en soit, il en résulte que les terminaisons à GnRH isolées de leur corps cellulaire sont capables d'adapter un mode de sécrétion pulsatile. Le mécanisme de régulation et de coordination de ces pulses pourrait se situer directement au niveau des axones et des terminaisons dans l'EM, ou paraît nécessiter la participation des corps cellulaires des neurones du noyau arqué. Les travaux sur le mode de sécrétion de la GnRH *ex vivo* sont à rapprocher de ceux menés sur des cultures primaires de neurones à GnRH (Melrose *et al.*, 1987) et sur les lignées cellulaires de neurones à GnRH immortalisés : les cellules GT<sub>1</sub>-7 (Mellon *et al.*, 1990 ; Krsmanovic *et al.*, 1992, 1994 ; Martinez de la Escalera *et al.*, 1992 ; Weiner *et al.*, 1993). Dans ces travaux, les neurones à GnRH, en l'absence d'afférences, sécrètent la GnRH dans le milieu d'incubation sur un mode pulsatile. Très récemment, une étude de Lopez *et al.* (1997) montre que les neurones GT<sub>1</sub>-7 expriment la NOS neuronale (nNOS). L'activité de cet enzyme semble être indispensable pour permettre la synchronisation de l'activité d'un groupe de neurones et permettre de générer une sécrétion pulsatile de GnRH dans le milieu (Lopez *et al.*, 1997). Etant donné qu'*in vivo* les neurones à GnRH ne semblent pas exprimer la NOS neuronale (Herbison *et al.*, 1996), il est possible d'envisager que la pulsativité de la sécrétion de la GnRH par les fragments d'HMB ou d'EM puisse être engendrée par une source de monoxyde d'azote localisée dans l'éminence médiane ; or, à ce niveau de l'hypothalamus, la distribution anatomique de la NOS (Cecatelli *et al.*, 1992) permet deux origines possibles pour ce NO : l'une neuronale, l'autre endothéliale.

***Modulation de la sécrétion basale de GnRH par les stéroïdes gonadiques.*** L'équipe de Ramirez (Ramirez *et al.*, 1980 ; Kim et Ramirez, 1982, 1986 ; Ke et Ramirez, 1987) a montré *in vitro*, sur des fragments d'APO-HMB, l'importance des stéroïdes gonadiques et en particulier de la progestérone, sur la sécrétion de la GnRH. L'action stimulatrice de la

progestérone sur la sécrétion de GnRH nécessite une imprégnation œstrogénique préalable, et ne peut donc être obtenue que sur des fragments d'APO-HMB de femelles ovariectomisées traitées par de l'œstradiol (OVX + E<sub>2</sub>) (Kim et Ramirez, 1982), ou de femelles en proœstrus (Kim et Ramirez, 1986).

Parallèlement à ces travaux, Miyake *et al.* (1982) et Rasmussen et Yen (1983) montrent que les effets de la progestérone sur des fragments d'HMB sont identiques à ceux observés sur des fragments APO-HMB, suggérant que l'action majeure de la progestérone sur la sécrétion de la GnRH ne se fait pas au niveau de l'aire préoptique, mais au niveau de l'hypothalamus médiobasal. Drouva *et al.* (1985) déterminent que l'effet de la progestérone sur la sécrétion de GnRH dans l'HMB nécessite une imprégnation estrogénique préalable et implique une entrée de calcium, ainsi que l'activation de la calmoduline et de la voie des protéines kinases qui lui sont associées. Fait notable, Kim et Ramirez montrent, en 1985, que la progestérone est capable d'induire chez des femelles OVX + E<sub>2</sub> une sécrétion de GnRH, non seulement à partir de fragments de HMB, mais aussi à partir de fragments d'EM. Les auteurs remarquent que le mode de sécrétion de la GnRH induite par la progestérone sur des fragments d'EM, est différent de celui observé pour les fragments d'HMB et d'APO-HMB. Ces résultats suggèrent que les afférences provenant de l'aire préoptique ou de l'hypothalamus médiobasal seraient responsables de la modulation de la réponse des terminaisons nerveuses de l'éminence médiane à l'activation de la sécrétion de GnRH par la progestérone, mais que le site d'action privilégié de la progestérone permettant d'induire le pic préovulatoire de GnRH pourrait être l'éminence médiane. L'éminence médiane pourrait par ailleurs, également être le siège de l'action inhibitrice de la progestérone sur la sécrétion de la GnRH, lors de la phase tardive du pic de LH. En effet, Drouva *et al.*, (1983) montrent que la sensibilité des fragments d'HMB à une dépolarisation induite par le potassium est minimale chez les femelles OVX + E<sub>2</sub> + P, 16 à 36 heures après traitement par la progestérone, alors qu'elle est maximale chez les femelles OVX + E<sub>2</sub> + P, 4 heures après traitement par la progestérone.

Nous noterons que les œstrogènes sont aussi capables, à eux seuls, d'augmenter l'activité de sécrétion de la GnRH par des fragments d'HMB (Miyake *et al.*, 1982) et d'accroître la sensibilité de ces fragments aux dépolarisations induites par le potassium (Drouva *et al.*, 1983). Lors de la puberté, les œstrogènes augmentent la sensibilité des



**Figure 3.** Régulation de la libération de GnRH au niveau de l'émence médiane

Tan. : tanocyte



terminaisons à GnRH aux prostaglandines, et entraînent ainsi une sécrétion accrue de GnRH par les fragments d'EM (Ojeda *et al.* 1986). Ce phénomène semble s'expliquer par le fait que les œstrogènes stimulent l'expression du récepteur aux PGE<sub>2</sub> dans les neurones à GnRH (Rage *et al.*, 1997). Enfin nous évoquerons le travail de Drouva *et al.* (1984) montrant de manière étonnante, que des concentrations nanomolaires d'œstradiol stimulent une sécrétion rapide de GnRH par des fragments d'HMB de femelle OVX. L'œstradiol semble agir sur un récepteur de façon spécifique, mais étant donné la rapidité des effets observés, l'interaction de la molécule avec son récepteur ne semble pas induire une synthèse *de novo* de protéines (Drouva *et al.*, 1984). Les auteurs émettent alors l'hypothèse d'une action membranaire de l'œstradiol.

### **Régulation de la sécrétion de la GnRH au niveau des terminaisons de la zone externe de l'éminence médiane par des facteurs neuronaux (Figure 3.)**

*Implication de la GnRH dans la régulation de sa propre sécrétion.* En 1987, plusieurs équipes montrent que la GnRH a un effet inhibiteur sur sa propre sécrétion (Zanisi *et al.*, 1987 ; Bourguignon *et al.*, 1987 ; De Paolo *et al.*, 1987), et ainsi, la GnRH pourrait contrôler l'activité sécrétoire de GnRH au niveau de l'éminence médiane par une rétroaction négative très courte. Les analogues de la GnRH, appliqués sur des fragments d'HMB de rat, inhibent la sécrétion basale de GnRH et la sécrétion de GnRH induite par de fortes concentrations de potassium (Zanisi *et al.*, 1987), mais aussi la sécrétion pulsatile de GnRH (Bourguignon *et al.*, 1987). Cependant le site d'action de cette inhibition est localisé au niveau du noyau arqué et non pas dans l'éminence médiane : les analogues de la GnRH n'ont aucun effet sur la sécrétion de GnRH lorsqu'ils sont appliqués sur des fragments d'éminence médiane (De Paolo *et al.*, 1987). Ultérieurement Feleder *et al.* (1996) montrent que la GnRH, appliquée sur des fragments d'HMB *in vitro*, inhibe la sécrétion basale de glutamate et stimule celle de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) ; ainsi la GnRH pourrait avoir un effet double sur le système à GnRH: un effet inhibiteur sur la sécrétion d'un facteur stimulateur, le glutamate, et un effet stimulateur sur la sécrétion d'un facteur inhibiteur, le GABA.

***Implication des catécholamines dans la régulation de la libération de GnRH.*** Le rôle des catécholamines dans la régulation de la sécrétion de GnRH au niveau des terminaisons nerveuses de la zone externe de l'éminence médiane a été étudié très tôt du fait qu'ils ont été les premiers neurotransmetteurs mis en évidence dans l'éminence médiane. En 1976, Rotsztein *et al.* montrent que la dopamine stimule *in vitro* une libération rapide de GnRH par des fragments d'HMB de mâles intacts et de femelles OVX + E<sub>2</sub>. Par contre la dopamine ne stimule pas une telle libération par des HMB de femelles OVX non supplémentées. Ultérieurement, l'équipe de McCann (Ojeda *et al.*, 1979 ; Negro-Vilar *et al.*, 1979) montre un effet stimulateur de la dopamine sur la sécrétion de GnRH directement au niveau de l'éminence médiane ; l'utilisation d'un inhibiteur de l'enzyme permettant la transformation de dopamine en noradrénaline a, de plus, prouvé que les effets observés sur la sécrétion de GnRH étaient bien ceux de la dopamine (Negro-Vilar *et al.*, 1979). Negro-Vilar *et al.* (1979) indiquent, par ailleurs, que les concentrations de dopamine, nécessaires pour stimuler la libération de GnRH par des fragments d'HMB sont plus élevées que celles utilisées pour les fragments d'éminence médiane. D'autres auteurs n'ont pas réussi à montrer d'effets stimulateurs de la dopamine sur la sécrétion de GnRH par des fragments d'HMB (Lengyel *et al.*, 1985).

Une action de la dopamine sur la sécrétion de GnRH au niveau de l'éminence médiane est renforcée par le fait qu'il existe, dans cette partie de l'hypothalamus, des sites de liaisons pour le récepteur de type D-1 (Fuxe *et al.*, 1983). Or, la dopamine est connue pour stimuler la sécrétion de GnRH par les neurones GT<sub>1</sub> via l'activation de ce type de récepteurs (Martinez de la Escalera *et al.*, 1992). De plus, des études immunohistochimiques réalisées en microscopie électronique montrent des appositions axo-axoniques entre des fibres à GnRH et celles à dopamine (Ugrumov *et al.*, 1989). Par ailleurs, les tanocytes de l'éminence médiane, immunoréactives pour le DARPP-32, marqueur de l'existence d'un récepteur de type D-1 (Everitt *et al.*, 1986 ; Meister *et al.*, 1988), pourraient participer à l'effet stimulateur de la dopamine sur la sécrétion de GnRH, via la sécrétion de PGE<sub>2</sub> (Ojeda *et al.*, 1979). La dopamine pourrait aussi être l'un des médiateurs de l'action inhibitrice des peptides opioïdes endogènes sur la sécrétion de GnRH. En effet, Rotsztein *et al.* (1978) montrent que la Met-enképhaline inhibe la sécrétion de GnRH induite par la dopamine. Cette

médiation de l'effet inhibiteur des peptides opioïdes sur le système à GnRH par les catécholamines est renforcée par le fait que la naloxone, inhibiteur des récepteurs aux peptides opioïdes endogènes, stimule de manière concomitante, la sécrétion de GnRH, la sécrétion de dopamine et celle de noradrénaline, par des fragments d'APO-HMB (Leadem *et al.*, 1985) ou d'EM (Rasmussen *et al.*, 1988). La possibilité d'interactions peptides opioïdes-dopamine est renforcée par la mise en évidence de la présence d'enképhalinase sur les terminaisons à dopamine de l'éminence médiane (Vandenbulke *et al.*, 1994). Cette étude morphologique suggère donc que les fibres et les terminaisons catécholaminergiques de l'éminence médiane pourraient être la cible directe des peptides opioïdes, et être ainsi les médiateurs de l'action inhibitrice de ces derniers sur la sécrétion de GnRH au niveau de l'éminence médiane.

La noradrénaline semble avoir des effets analogues à ceux de la dopamine sur la sécrétion de la GnRH (Negro-Vilar *et al.*, 1979 ; Ojeda *et al.*, 1979 ; Jarjour *et al.*, 1986). Les effets stimulateurs de la noradrénaline sur la sécrétion de GnRH semble passer par l'activation d'un récepteur  $\alpha$ -adrénergique (Sarkar et Fink, 1981 ; Ojeda *et al.*, 1982). De manière surprenante, Martinez de la Escalera *et al.* (1992b) montrent que la noradrénaline stimule la libération de GnRH par les neurones GT<sub>1</sub> via l'activation d'un récepteur  $\beta_1$ -adrénergique.

***Implication des acides aminés excitateurs dans la régulation de la libération de GnRH.*** Comme nous l'avons souligné dans le chapitre précédent, le glutamate et/ou l'aspartate sont connus pour avoir un effet stimulateur important sur la sécrétion de GnRH *in vivo* (Kalra *et al.*, 1997). *In vitro*, ces acides aminés excitateurs sont capables d'induire une libération de GnRH par des fragments d'HMB (Bourguignon *et al.*, 1989 ; Bourguignon *et al.*, 1989 ; Donoso *et al.*, 1990 ; Lopez *et al.*, 1992 ; Arias *et al.*, 1993 ; Kawakami *et al.*, 1998b). Par conséquent, une partie, des effets modulateurs, des acides aminés excitateurs sur l'activité du système à GnRH s'exerce à ce niveau de l'hypothalamus. Des expériences pharmacologiques pratiquées sur des fragments d'HMB tendent à montrer que les effets majeurs des acides aminés excitateurs sur la sécrétion de GnRH passeraient par l'activation des récepteurs kaïnate et NMDA (Bourguignon *et al.*, 1989 ; Donoso *et al.*, 1990 ; Lopez *et al.*, 1992). Bourguignon *et al.* (1989) montrent que la sécrétion pulsatile de GnRH est

supprimée par un antagoniste des récepteurs NMDA, alors qu'elle n'est pas perturbée par un antagoniste des récepteurs AMPA/kainate. Cependant les travaux de l'équipe de Negro-Vilar montrent qu'en présence de faibles concentrations de glutamate et/ou d'aspartate, ce sont les récepteurs non-NMDA (AMPA/kainate) qui sont préférentiellement impliqués dans la régulation de la libération de GnRH, et les récepteurs NMDA ne seraient activés qu'en présence de fortes concentrations de ligand (Lopez et Negro-Vilar, 1990 ; Lopez *et al.*, 1992). La sécrétion de GnRH induite par l'addition de NMDA sur des fragments d'HMB passerait via la stimulation d'une sécrétion de NO (Bonavera *et al.*, 1993 ; Baht *et al.*, 1998). Sur la lignée neuronale GT1-1, la stimulation du récepteur NMDA par un agoniste induit une sécrétion accrue de GnRH, mais son inhibition à l'état basal n'altère pas la sécrétion pulsatile de la GnRH (Mahachoklertwattana *et al.*, 1994) ; ceci semble indiquer que la pulsativité des neurones à GnRH en culture n'est pas régulée par le glutamate et/ou l'aspartate. D'après les auteurs, le NO serait, comme pour les fragments d'HMB, le médiateur de l'effet stimulateur du NMDA sur la sécrétion de GnRH par les neurones GT1-1.

Les études morphologiques montrent que les acides aminés excitateurs peuvent réguler la sécrétion de GnRH au niveau de l'éminence médiane, soit en agissant directement sur les terminaisons nerveuses à GnRH, soit en agissant sur les terminaisons d'autres systèmes, ou encore sur les tanocytes. En effet, des études immunohistochimiques réalisées à l'échelle ultrastructurale mettent en évidence, dans la zone externe de l'éminence médiane, l'expression des récepteurs NMDA-R1 et KA2 (récepteur au Kainate) dans les terminaisons à GnRH (Kawakami *et al.*, 1998a), et celle des récepteurs NMDA-R1, des récepteurs AMPA GluR1 et GluR2/3, des récepteurs kainates GluR6/7 et KA2 dans des terminaisons non-GnRH (Kawakami *et al.*, 1998b). Les récepteurs au kainate GluR5-7 (Diano *et al.*, 1998) et GluR7 (Eyigor et Jennes, 1998), sont quant à eux exprimés dans les tanocytes.

**Implication du GABA.** L'action du GABA sur la sécrétion de GnRH *in vitro* reste ambiguë, tout comme l'est son action sur la sécrétion de la LH *in vivo* qui peut être, soit stimulatrice (Ondo, 1974), soit inhibitrice (Masotto et Negro-Vilar, 1987). McRee et Meyer (1993) montrent que le GABA a un effet inhibiteur sur la sécrétion de la GnRH par des fragments d'APO-HMB de femelles contenant de faibles taux d'œstrogènes plasmatiques, alors qu'il n'a aucun effet lorsque ces taux sont élevées, comme le jour du proœstrus. Sur

l'HMB de mâle, Masotto *et al.* (1989) montrent que le GABA a un effet double. En effet, les agonistes du récepteur GABA<sub>A</sub> stimulent la libération de GnRH, et sembleraient potentialiser l'action stimulatrice des PGE<sub>2</sub> sur la libération de GnRH, alors que les agonistes du récepteur GABA<sub>B</sub> inhibent la libération de GnRH par les fragments d'HMB. En conclusion, au niveau de l'hypothalamus médiobasal, les effets du GABA sur la sécrétion de GnRH semblent être différents selon le type de récepteur GABAergique activé.

### ***Régulation de la sécrétion in vitro de GnRH par les neuropeptides stimulateurs et inhibiteurs***

#### **a- Les neuropeptides stimulateurs**

**Le NPY.** De nombreuses études montrent que les effets du NPY sur la libération de GnRH par des fragments d'HMB ou d'EM maintenus en survie, varient fortement en fonction de l'imprégnation stéroïdienne des animaux étudiés (Crowley et Kalra, 1987 ; Khorram *et al.*, 1988 ; Sabatino *et al.*, 1989, 1990 ; Sahu *et al.*, 1992 ; Besecke et Levine, 1994 ; Urban *et al.*, 1996). Le NPY n'a aucun effet sur la libération de GnRH par des fragments d'HMB ou d'EM de femelles OVX (Crowley et Kalra, 1987 ; Khorram *et al.*, 1988 ; Sabatino *et al.*, 1989, 1990) ou par des fragments d'EM de mâles castrés (Urban *et al.*, 1996). Par contre, il stimule fortement la libération de GnRH par des fragments issus de femelles OVX + E<sub>2</sub> ou OVX + E<sub>2</sub> + P (Crowley et Kalra, 1987 ; Khorram *et al.*, 1988 ; Sabatino *et al.*, 1989, 1990) ou de mâles castrés traités par de la testostérone (Urban, *et al.*, 1996). Besecke et Levin (1994) confirment ce phénomène chez les femelles cycliques : le NPY ne stimule la sécrétion de GnRH par des fragments d'EM que le jour du proœstrus, jour du cycle où les taux d'œstrogènes plasmatiques sont maximaux. Cette stéroïdo-dépendance des effets du NPY sur la libération de GnRH pourrait être liée à une augmentation de l'expression du NPY au niveau des corps cellulaires, localisés dans le noyau arqué, mais aussi, à la levée de l'inhibition exercée par les peptides opioïdes sur sa sécrétion (Sahu *et al.*, 1990 ; Xu *et al.*, 1996). Kalra *et al.* (1992) montrent que l'effet stimulateur du NPY sur la

libération de GnRH passe par l'activation d'un récepteur de type Y-1, et implique la mobilisation du calcium intracellulaire.

D'après les récents travaux de Bonavera *et al.* (1996), la sécrétion de NPY conduisant à la libération de la GnRH pourrait être induite par le NO *in vitro* et *in vivo*, et ce mécanisme serait crucial pour la survenue du pic préovulatoire de la LH. En effet, la suppression de la libération de NO chez des femelles OVX + E<sub>2</sub> + P, par l'injection d'inhibiteurs (Bonavera *et al.*, 1993, 1994) ou d'antisens (Aguan *et al.*, 1996) de la NOS, empêche la survenue du pic de LH induit par la progestérone ; de plus, l'injection intracérébroventriculaire de la L-arginine, molécule précurseur du NO, provoque la survenue d'un pic de LH chez des femelles OVX + E<sub>2</sub> ; cet effet est inhibé, lorsque, concomitamment à la L-arginine, sont injectés des antisens NPY.

**La galanine.** La galanine est, comme le NPY, un neuropeptide dont la sécrétion au niveau de l'éminence médiane est cruciale pour la survenue du pic préovulatoire de LH (Sahu *et al.*, 1994 ; Xu *et al.*, 1996b). Le travail de Xu *et al.* (1996) montre même que la galanine et le NPY pourraient agir de concert pour induire le pic préovulatoire de LH. Sur les fragments d'HMB, la galanine a un effet stimulateur sur la sécrétion de GnRH (Sahu *et al.*, 1994). Par ailleurs, la sécrétion basale de galanine semble être d'une importance capitale pour la sécrétion basale de GnRH (Lopez et Negro-Vilar, 1990 ; Sahu *et al.*, 1994), car cette dernière est fortement diminuée en présence de galantide, antagoniste des récepteurs de la galanine (Sahu *et al.*, 1994).

De nombreux sites de liaisons pour la galanine sont présents sur les terminaisons de la zone externe de l'éminence médiane (Lagny-Pourmir *et al.*, 1992 ; Dutriez *et al.*, 1997). La seule étude morphologique jusqu'alors entreprise sur le sujet en microscopie électronique (Dutriez *et al.*, 1997), montre la présence de sites de liaisons sur les terminaisons nerveuses de la zone externe de l'éminence médiane sans cependant pouvoir en préciser le nature. Les travaux très récents de Mitchell *et al.* (1999), permettent de visualiser l'expression de l'ARNm du récepteur à la galanine GalR1 dans certains neurones à GnRH à des moments précis du cycle œstral. Ces résultats suggèrent que des récepteurs à galanine pourraient, après traduction, être transportés vers l'éminence médiane. Par conséquent, la galanine pourrait agir directement sur les terminaisons nerveuses à GnRH.

**La neurotensine.** L'implication de la neurotensine dans la régulation de la sécrétion de GnRH au niveau de l'éminence médiane est méconnue. La seule information dont nous disposons est que, dans l'éminence médiane, les taux de neurotensine mesurées par push pull cannula augmentent de manière concomitante avec ceux de GnRH, chez des femelles OVX + E<sub>2</sub> (Watanoble et Takebe, 1993).

#### b- Neuropeptides inhibiteurs

**Les peptides opioïdes.** L'utilisation de la naloxone, antagoniste des récepteurs aux peptides opioïdes, montre que les fragments d'HMB ou d'EM de femelles OVX ou OVX + E<sub>2</sub>, sont encore sous l'influence des peptides opioïdes endogènes lorsqu'ils sont maintenus en survie *in vitro* (Leaden *et al.*, 1985 ; Kalra *et al.*, 1987 ; Rasmussen *et al.*, 1988 ; Sahu *et al.*, 1990 ; Rubin, 1993). En effet, la sécrétion de GnRH par ces fragments est fortement augmentée sous l'influence de la naloxone (Leaden *et al.*, 1985 ; Kalra *et al.*, 1987 ; Rasmussen *et al.*, 1988 ; Sahu *et al.*, 1990 ; Rubin, 1993). D'après Bhat *et al.* (1998), la naloxone entraînerait, *in vivo*, une forte augmentation de l'activité NOS via l'activation du système glutamatergique. En effet, l'injection d'antagonistes du récepteur NMDA, inhibe cet effet stimulateur de la naloxone sur l'activité NOS de l'APO mais aussi de l'HMB. Les auteurs montrent, *in vitro*, sur des fragments d'HMB, que le NMDA stimule l'activité NOS, et suggèrent ainsi que les peptides opioïdes endogènes pourraient inhiber la sécrétion de la GnRH en empêchant la sécrétion de glutamate, et donc la stimulation de l'activité NOS de cette région.

*In vivo*, Sarkar et Minami (1995) montrent qu'il existe un rythme nyctéméral pour la sécrétion de  $\beta$ -endorphine dans le sang porte hypophysaire, et qu'il y a une corrélation inverse entre les taux de GnRH et les taux de  $\beta$ -endorphine mesurés dans la circulation porte. Au cours du cycle œstral les taux de  $\beta$ -endorphine sont plus élevés dans la circulation porte le matin que le soir, et cette différence est particulièrement marquée le jour du proœstrus (Sarkar et Minami, 1995).

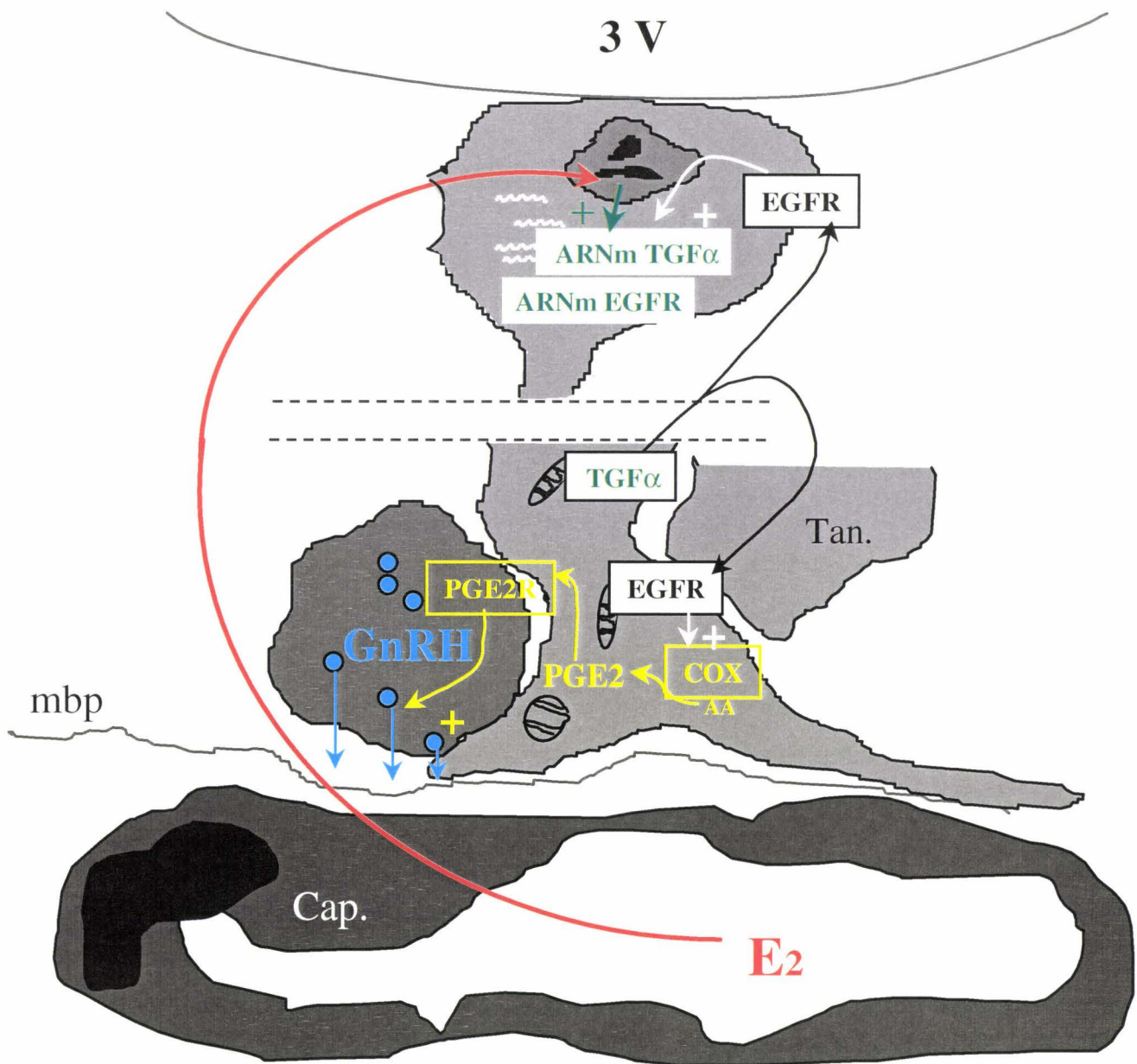
**Les tachykinines.** Les neurokinines A et B ne semblent pas être impliquées dans la régulation de la sécrétion de GnRH/LH ; le neuropeptide  $\gamma$ , injecté en intracérébroventriculaire chez des femelles OVX, semble avoir un faible effet inhibiteur sur la sécrétion de LH (Sahu et Kalra, 1992). La substance P a un effet peu clair sur la sécrétion de GnRH/LH. En effet, Ohtsuka *et al.* (1987) montrent qu'elle a un effet stimulateur sur la sécrétion de GnRH par des fragments d'HMB de femelles en diœstrus, ou OVX, ou encore OVX + E<sub>2</sub> ; elle stimule également la sécrétion de LH lors d'une co-incubation de fragments d'HMB et d'antéhypophysés de femelles en diœstrus ou OVX + E<sub>2</sub>, mais elle n'a aucun effet sur la sécrétion de LH par des antéhypophysés incubées seules. Cependant, l'injection intracérébroventriculaire de substance P n'a aucun effet sur la sécrétion de LH (Sahu et Kalra, 1992). Le neuropeptide K, quant à lui, est un inhibiteur très efficace de la sécrétion de GnRH/LH : il inhibe la libération de GnRH par des fragments d'HMB induite par une dépolarisation, ou encore la survenue du pic de LH induit par la progestérone lorsqu'il est injecté en intracérébroventriculaire chez des femelles OVX + E<sub>2</sub> + P (Sahu et Kalra, 1992). Cette action inhibitrice du neuropeptide K semblerait passer par l'activation d'un récepteur NK-2 (Sahu et Kalra, 1992).

**La corticolibérine ou CRF.** Le CRF est connu pour inhiber la libération de GnRH par les fragments d'HMB ou d'EM maintenus en survie *in vitro* (Nikolarakis *et al.*, 1986a ; Gambacciani *et al.*, 1986 ; Calogero *et al.*, 1994, 1996). Cette action du CRF semblerait impliquer les peptides opioïdes endogènes, du fait qu'elle est levée en présence de naloxone (Petraglia *et al.*, 1987 ; Almeida *et al.*, 1988). Par ailleurs, le CRF est connu pour stimuler la libération de  $\beta$ -endorphine et de dynorphine (Nikolarakis *et al.*, 1986b).

**Régulation de la sécrétion de GnRH *in vitro* par les facteurs de croissance d'origine centrale ou périphérique.**

**Les TGFs.** En 1990, Ojeda *et al.* montrent que le TGF $\alpha$  et l'EGF stimulent la libération de GnRH par des fragments d'EM de rate juvénile via l'activation du récepteur à l'EGF. L'ARNm de l'EGF n'étant pas exprimé dans l'hypothalamus, contrairement à celui





**Figure 4.** Régulation de la libération de GnRH par le TGF $\alpha$  au niveau de l'émence médiane

3V: troisième ventricule  
 Tan. : tanocyte  
 Cap. : capillaire  
 mbp : lame basale parenchymateuse

du  $TGF^\alpha$ , les auteurs en déduisent que le facteur actif *in vivo* serait le  $TGF^\alpha$  (Ojeda *et al.*, 1990). La libération de GnRH induite par le  $TGF^\alpha$  est associée à une libération de  $PGE_2$ . L'inhibition du mécanisme de transduction du récepteur à l'EGF, inhibe à la fois la libération de GnRH et la sécrétion de  $PGE_2$ , sans toutefois altérer la capacité des  $PGE_2$  à stimuler la libération de GnRH. Ceci indiquerait que le  $TGF^\alpha$  stimule la libération de GnRH via la sécrétion de prostaglandines (Ojeda *et al.*, 1990). Alors que les neurones à GnRH ne semblent pas exprimer le gène du récepteur à l'EGF, une expression de ce dernier est visible dans les cellules gliales de l'hypothalamus (Ma *et al.*, 1994a, 1994b). Le  $TGF^\alpha$  semblerait activer la sécrétion de GnRH au niveau de l'éminence médiane par une activation autocrine / paracrine des tancytes (Ma *et al.*, 1992). Cette hypothèse se confirme par le fait que, *in vitro*, l'addition d'un milieu de culture d'astrocytes exposés au  $TGF^\alpha$ , à une culture de neurones GT1-1, stimule la sécrétion de GnRH, alors que le  $TGF^\alpha$  ajouté directement dans cette dernière est sans effet (Ma *et al.*, 1997) (Figure 4.).

Un facteur autre que le  $TGF^\alpha$ , semble aussi stimuler la sécrétion de GnRH par les neurones GT1-1 *in vitro* : le  $TGF^\beta_1$  (Melcangi *et al.*, 1995). Ce facteur de croissance, comme le  $TGF^\alpha$  serait d'origine gliale (Melcangi *et al.*, 1995). Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a montré l'expression de son ARNm dans le cerveau dans des conditions physiologiques, et aucune étude n'a jusqu'alors été réalisée pour savoir si ce facteur avait des sites de liaisons dans le cerveau. Par ailleurs, les  $TGF^\beta_1$  et  $\beta_2$  ne stimulent pas, contrairement au  $TGF^\alpha$ , la sécrétion de GnRH par des fragments d'EM de rats juvéniles (Ojeda *et al.*, 1990).

Par contre, un autre membre de la superfamille des  $TGF^\beta$ , l'activine, semble stimuler la libération de GnRH *in vitro* à la fois par les neurones à GnRH de la lignée GT1-7 (Gonzalez-Manchon *et al.*, 1991), et par des fragments d'hypothalamus (Calogero *et al.*, 1998). L'activine, initialement isolée dans les gonades (Meunier *et al.*, 1988), est une molécule synthétisée par certaines populations neuronales du septum et de l'aire préoptique (Vale *et al.*, 1988), et son récepteur ActRII est exprimé dans divers noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la reproduction (Cameron *et al.*, 1994).

**Les IGFs.** L'IGF-I (insulin growth factor) est un facteur de croissance périphérique dont l'effet sur la sécrétion de GnRH *in vitro* est ambiguë. L'action de l'IGF-I sur la sécrétion de GnRH semble varier selon la partie de l'hypothalamus étudiée. En effet, Hiney *et al.*, (1991) montrent que l'IGF-I est capable de stimuler la sécrétion de GnRH par des fragments d'EM, alors qu'il aurait un effet inhibiteur sur la sécrétion de GnRH par des fragments d'HMB (Bourguignon *et al.*, 1993).

**Régulation de la libération de GnRH *in vitro* par la leptine.** La leptine est une hormone périphérique sécrétée par le tissu adipeux, impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions telles que l'homéostasie énergétique, le comportement alimentaire et la fonction de reproduction (voir pour revue Buchanan *et al.*, 1998). En 1997, le groupe de McCann montre que la leptine module la fonction hypothalamo-hypophysaire, en agissant à la fois sur l'hypophyse pour stimuler la sécrétion de LH et de FSH, et au niveau de l'HMB en stimulant la libération de GnRH (Yu *et al.*, 1997). Nous noterons qu'à fortes doses, la leptine apparaît inhiber la sécrétion de GnRH par des fragments d'HMB (Yu *et al.*, 1997a). La libération de GnRH induite par la leptine semblerait se faire via la sécrétion de NO, car celle-ci est inhibée par l'ajout d'inhibiteurs de NOS dans le milieu d'incubation des HMB (Yu *et al.*, 1997b).

**Régulation de la sécrétion de GnRH au niveau de l'éminence médiane par le NO.** Comme nous l'avons détaillé préalablement, le NO paraît jouer un rôle crucial dans la régulation du système à GnRH du fait qu'il est le médiateur de l'action stimulatrice ou inhibitrice de nombreux neurotransmetteurs et neuropeptides sur l'activité des neurones à GnRH. Au niveau de l'éminence médiane, le NO semblerait être impliqué dans la médiation des effets stimulateurs sur la sécrétion de GnRH, de la noradrénaline (Rettori *et al.*, 1992, 1993, 1997 ; Canteros *et al.*, 1996), du glutamate (Bonavera *et al.*, 1993 ; Bhat *et al.*, 1998), et du NPY (Bonavera *et al.*, 1996), ainsi que de l'effet inhibiteur du GABA (Seilicovich *et al.*, 1995).

La stimulation de la sécrétion de GnRH par le NO au niveau de l'éminence médiane pourrait passer par l'activation de la guanylyl cyclase directement au niveau des terminaisons

à GnRH (Moretto *et al.*, 1993 ; Lopez *et al.*, 1997), ou encore par l'activation de la cyclooxygénase et la production de prostaglandines (Rettori *et al.*, 1992). Cet effet stimulateur du NO sur la fonction GnRH dans l'éminence médiane semble être admise, mais il se pose alors la question de l'origine de ce gaz dans cette partie de l'hypothalamus. En effet, contrairement à la source de NO dans l'aire préoptique qui est assurément d'origine neuronale (Pu *et al.*, 1997 ; Pu *et al.*, 1998a, 1998b), la source de NO dans l'éminence médiane est loin d'être évidente. Dans l'éminence médiane, l'immunoréactivité pour la nNOS est localisée dans la zone interne, dans les fibres de neurones qui se projettent dans la neurohypophyse (Ceccatelli *et al.*, 1992 ; Yamada *et al.*, 1996, Herbisson *et al.*, 1996), et ne recouvre jamais celle de la GnRH (Herbisson *et al.*, 1996). Par ailleurs, une forte immunoréactivité pour la NOS endothéliale constitutive (ecNOS) se retrouve au niveau des capillaires du plexus porte hypophysaire (Ceccatelli *et al.*, 1992 ; Yamada *et al.*, 1996), à proximité immédiate des terminaisons nerveuses des différents systèmes hypophysiotropes localisés dans la zone externe de l'éminence médiane. Ainsi la source du NO dans l'éminence médiane reste à définir.

## **II.5. Notion de plasticité neuro-gliale dans l'éminence médiane.**

En 1985, Kozłowski et Coates, étonnés de n'observer que de très rares terminaisons à GnRH au contact de l'espace péricapillaire chez le rat mâle, en déduisent que vraisemblablement, d'importants remaniements morphologiques doivent exister au cours du cycle œstral dans la zone externe de l'éminence médiane chez la rate. Cette plasticité pourrait permettre aux terminaisons à GnRH de libérer leur neurohormone dans le sang porte hypophysaire, et ainsi la survenue du pic préovulatoire de GnRH/LH l'après-midi du proœstrus. En 1995, au moment où ce travail de thèse a été entrepris, l'existence d'une telle plasticité neuro-gliale n'avait pas encore été démontrée. Les seuls travaux entrepris sur le sujet ont été ceux de l'équipe de King, qui a montré une variation de charge de GnRH dans la zone externe de l'éminence médiane après gonadectomie (King et Letourneau, 1994 ; Rubin et King, 1995 ; King et Rubin, 1995 ; King *et al.*, 1996).

L'éminence médiane semble cependant être une structure capable d'une grande plasticité. En effet, la surrénalectomie bilatérale entraîne, chez le rat, un remaniement

morphologique de la zone externe de l'éminence médiane qui se traduit par une augmentation du nombre de contacts neurovasculaires, associé à la diminution proportionnelle du nombre de contacts gliovasculaires (Wittkowski et Scheuer, 1974). Par ailleurs, l'éminence médiane adulte possède de nombreuses caractéristiques retrouvées dans les tissus embryonnaires, telle que l'expression de la molécule d'adhésion NCAM sous sa forme polysialylée, PSA-NCAM. Cette observation témoigne d'une faible adhésion entre les différents types cellulaires de cette région (Bonfanti *et al.*, 1992 ; Alonso *et al.*, 1997) et d'une capacité, pour ces derniers à changer de morphologie (Sunshine *et al.*, 1987). L'expression, par de nombreuses terminaisons, de Gap-43 (Alonso *et al.*, 1997), protéine exprimée dans le cône de croissance des neurones embryonnaires et responsable de la transduction des signaux intra- et extracellulaires modulant la réorganisation du cytosquelette dans la terminaison (Benowitz et Routtenberg, 1997), est également en faveur de l'existence d'une plasticité dans cette région.

Les épendymocytes de l'éminence médiane (tanocytes), sont caractérisés, entre autres, par l'expression constitutive de vimentine, filament intermédiaire du cytosquelette dont la fonction reste inconnue, mais qui est exprimé par des cellules immatures, des cellules en mouvement, et par des cellules impliquées dans la neurogénèse et la migration neuronale (Dahl *et al.*, 1981 ; Giordana *et al.*, 1992 ; Pixley et Vellis, 1984). Théodosis et Poulain (1993) émettent l'hypothèse que l'expression de la vimentine pourrait être un marqueur de cellules gliales sujettes à des changements morphologiques. Cette vision semble être renforcée par le fait qu'après lésion, la régénération d'axones dans l'éminence médiane semble être liée à la présence de prolongements gliaux immunoréactifs pour la vimentine, et non pour la GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Chauvet *et al.*, 1998). Par ailleurs, Chauvet *et al.* (1996) ont montré que les tanocytes étaient capables de promouvoir la survie et la croissance des neurites de neurones en coculture : leur effet neurotrophique est en fait cinq fois supérieur à celui des astrocytes. De plus ces propriétés neurotrophiques des tanocytes passent par l'expression de facteurs non diffusibles. Certains faits expérimentaux indiquent que l'éminence médiane serait capable d'émettre des facteurs diffusibles permettant de promouvoir la migration des neurones à GnRH embryonnaires greffés chez des souris hypogonadiques adultes (Silverman *et al.*, 1991 ; Rogers *et al.*, 1997). D'après une étude

préliminaire, ces facteurs diffusibles ne seraient pas sécrétés par des cellules gliales, mais de manière surprenante, par les cellules endothéliales (Gibson *et al.*, 1998).

## II.6 Conclusion

Nous avons ainsi rappelé l'existence de nombreuses régulations s'exerçant sur le système à GnRH au niveau de l'éminence médiane via l'action d'intermédiaires aussi variés que des neurohormones, des neuromédiateurs, des facteurs gliaux et des facteurs humoraux. De plus, nous avons relaté qu'un phénomène plus général, tel que la plasticité, pouvait participer à la régulation de la sécrétion de la GnRH dans les capillaires du plexus porte hypophysaire. La fréquence et l'amplitude de la libération de GnRH dans le sang porte pourrait ainsi résulter de l'intrication complexe de l'ensemble de ces modes d'influences s'exerçant au niveau des terminaisons à GnRH.

Lors de notre travail de thèse, nous nous sommes focalisés sur deux aspects de la régulation de la libération de GnRH au niveau de l'éminence médiane, pour lesquels de nombreux sujets de controverse existaient.

Le premier point concerne l'éventuelle implication d'une plasticité neuro-gliale dans la régulation de la sécrétion de GnRH, hypothèse énoncée depuis 1985, mais jamais démontrée. Compte tenu de l'expérience du laboratoire dans les techniques morphofonctionnelles utilisant notamment la microscopie électronique, il nous a en effet été possible d'aborder précisément ce problème qui demande une quantité importante d'observations.

Le deuxième point concerne l'étude précise de l'implication du NO dans la libération de GnRH. Cet aspect nous a paru intéressant : en effet, au début de notre thèse, nous avons pu collaborer avec une équipe américaine capable de quantifier en temps réel, la sécrétion de NO. Notre objectif était alors de déterminer la source du NO libéré au niveau de l'éminence médiane, et d'identifier les différents facteurs susceptibles d'en induire la synthèse.

# **OBJECTIFS**

# Objectifs

- I. Confirmer ou infirmer l'existence d'une plasticité neuro-gliale stéroïdo-dépendante permettant aux terminaisons à GnRH de contacter l'espace péricapillaire le jour du proestrus chez la rate**
  - I.1.** Montrer l'existence de contacts neurovasculaires pour les terminaisons à GnRH le jour du proestrus
  - I.2.** Mise en évidence d'une plasticité morphologique pour les terminaisons à GnRH de la zone externe de l'éminence médiane au cours du cycle œstral
- II. Déterminer les facteurs pouvant être le moteur d'une plasticité morphologique *in vivo***
- III. Implication du monoxyde d'azote (NO) dans la modulation de la libération de GnRH par les terminaisons nerveuses de la zone externe de l'éminence médiane**
  - III.1.** Déterminer l'aptitude de l'éminence médiane à répondre à une stimulation par la sécrétion de NO, implication sur la libération de neurohormones
  - III.2.** Déterminer l'origine du NO sécrété par l'éminence médiane
  - III.2.** Déterminer l'éventuelle implication des stéroïdes gonadiques dans la libération de GnRH induite par une sécrétion de NO



# RESULTATS

# Résultats

## I. Mise en évidence d'une plasticité morphologique stéroïdo-dépendante de la zone externe de l'éminence médiane

L'existence d'un pic préovulatoire de GnRH dans le sang porte hypophysaire, le soir du proœstrus, responsable de la sécrétion massive de LH et de FSH induisant l'ovulation, est connu depuis 1976 chez le rat (Sarkar, Chiappa et Fink, 1976). Mais de manière étonnante, le mécanisme permettant une telle libération de GnRH dans le sang porte reste mal connu : contrairement à tous les autres systèmes hypophysiotropes (Liposits *et al.*, 1983 ; Hisano *et al.*, 1986 ; Ibata *et al.*, 1986 ; Beauvillain *et al.*, 1984 ; Jew *et al.*, 1984 ; Bouchaud et Bosler, 1986), les terminaisons à GnRH ne sont jamais observées au contact de la membrane basale parenchymateuse bordant l'espace péricapillaire. En effet, les terminaisons nerveuses à GnRH de la zone externe de l'éminence médiane sont le plus souvent séparées de la lame basale parenchymateuse par des prolongements tanycytaires, qui parfois enrobent entièrement les terminaisons. Il faut noter que cette relation étroite entre terminaisons nerveuses et tanocytes dans la zone externe de l'éminence médiane, semble tout à fait particulière au système à GnRH (Ugrumov *et al.*, 1991). Ainsi se pose le problème du mode de passage de la GnRH des terminaisons nerveuses aux capillaires du plexus porte. En 1985, Kozlowsky et Coates, émettent l'hypothèse de l'existence de remaniements morphologiques permettant aux terminaisons à GnRH d'accéder à la membrane basale parenchymateuse, notamment le jour du proœstrus chez la femelle. De tels remaniements permettraient la libération massive de GnRH dans le sang porte, nécessaire à la survenue du pic préovulatoire de LH le jour du proœstrus, et pourraient résulter de phénomènes de plasticité stéroïdo-dépendants. Cette hypothèse n'a jusqu'alors jamais été démontrée. Seule une étude, réalisée à l'échelle ultrastructurale, montre une augmentation du nombre de terminaisons à GnRH immunoréactives dans la zone externe de l'éminence médiane après gonadectomie, mais sans contact neurovasculaire pour les terminaisons à GnRH (King et Letourneau, 1994).

Afin d'étudier l'éventuelle existence d'une plasticité, nous avons dans un premier temps, entrepris de réaliser une étude à l'échelle ultrastructurale de la zone externe de l'éminence médiane, au cours du cycle œstral chez la rate. Grâce à une technique immunocytochimique à l'or colloïdal après enrobage, nous avons étudié la localisation des terminaisons à GnRH ainsi que leur nombre et leur contenu. Cette étude a été réalisée chez les femelle sacrifiées à 17h le jour du diœstrus II (n = 4), à 9h (n = 8), 10h (n = 6), 13h (n = 5), 17h (n = 4) et 18h (n = 6) le jour du proœstrus et à 17h le jour de l'œstrus (n = 4). Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus chez les différents animaux étudiés, nous nous sommes placés à un niveau antéro-postérieur de l'éminence médiane précis et peu étendu. Notre étude de quantification s'est effectuée sur montages photographiques d'éminence médiane, et l'analyse s'est portée sur toutes les terminaisons localisées à moins de 10  $\mu\text{m}$  de la lame basale parenchymateuse. Pour chaque terminaison, la distance à la lame basale, la surface de la terminaison, et le nombre de grains d'or colloïdaux (qui reflète le contenu en GnRH de la terminaison) ont été quantifiés. Par ailleurs, l'état physiologique de chaque animal sacrifié a été vérifié par dosage radioimmunologique de LH, d'œstrogènes et de progestérone plasmatiques. Tout animal comportant un profil hormonal anormal a été éliminé de l'étude. Au total 37 animaux ont été étudiés. Cette première approche correspond à notre première publication (Article 1).

Compte tenu des résultats de ce premier travail, qui laisse fortement supposer l'existence d'une plasticité morphologique sans la démontrer définitivement, nous avons entrepris d'aborder la question en utilisant une approche permettant de suivre sur plusieurs microns l'évolution des terminaisons nerveuses par rapport à la membrane basale parenchymateuse. Dans ce but, nous avons réalisé un suivi sur coupes sériées des terminaisons à GnRH situées à moins de 5  $\mu\text{m}$  de la lame basale parenchymateuse. Parallèlement, nous avons quantifié le pourcentage d'évagination de la lame basale parenchymateuse sur montage photographique de l'éminence médiane. Ce travail a été entrepris chez des rates en diœstrus II (n = 3) et en proœstrus (n = 4) sacrifiées entre 15h et 16h (Article 2).



## SEMI-QUANTITATIVE ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF THE LOCALIZATION AND NEUROPEPTIDE CONTENT OF GONADOTROPIN RELEASING HORMONE NERVE TERMINALS IN THE MEDIAN EMINENCE THROUGHOUT THE ESTROUS CYCLE OF THE RAT

V. PREVOT,\* S. DUTOIT,\* D. CROIX,\* G. TRAMU† and J. C. BEAUVILLAIN\*

\*U 422 Institut National de la Santé et de La Recherche Médicale, place de Verdun, 59045 Lille cedex, France

†CNRS URA 339, Université Bordeaux I, avenue des Facultés, 33405 Talence cedex, France

**Abstract**—The ultrastructural appearance of gonadotropin releasing hormone-immunoreactive elements was studied in the external zone of the median eminence of adult female Wistar rats. On the one hand, the purpose of the study was to determine the distribution of gonadotropin releasing hormone terminals towards the parenchymatous basal lamina at the level of hypothalamo-hypophyseal portal vessels, throughout the estrous cycle. On the other hand, we have semi-quantified the gonadotropin releasing hormone content in nerve terminals or preterminals during this physiological condition. A morphometric study was coupled to a colloidal 15 nm gold postembedding immunocytochemistry procedure. Animals were killed at 09.00 on diestrus II, 09.00, 10.00, 13.00, 17.00 and 18.00 on proestrus and 09.00 on estrus ( $n=4-8$  rats/group). A preliminary light microscopic study was carried out to identify an antero-posterior part of median eminence strongly immunostained by anti-gonadotropin releasing hormone antibodies but which was, in addition, easily spotted. This last condition was necessary to make a good comparison between each animal. Contacts between gonadotropin releasing hormone nerve terminals and the basal lamina were observed only the day of proestrus. Such contacts, however, were rare and in the great majority of cases, gonadotropin releasing hormone terminals are separated from basal lamina by tanyctic end feet. The morphometric analysis showed no significant variation in average distance between gonadotropin releasing hormone terminals and capillaries throughout the estrous cycle. Consequently, it did not appear that a large neuroglial plasticity exists during the estrous cycle. However, the observation of contacts only on proestrus together with some ultrastructural images evoke the possibility of a slight plasticity.

The semi-quantitative results show that the content of gonadotropin releasing hormone in the nerve endings presented two peaks on proestrus: one at 09.00 ( $23 \pm 5$  particles/ $\mu\text{m}^2$ ,  $P < 0.03$ ) before the onset of luteinizing hormone surge, and the second at 18.00 ( $16 \pm 2$  particles/ $\mu\text{m}^2$ ,  $P < 0.01$ ) concomitantly with the luteinizing hormone surge, when compared to baseline values on proestrus 10.00 ( $8 \pm 1$  particles/ $\mu\text{m}^2$ ).

© 1998 IBRO. Published by Elsevier Science Ltd.

**Key words:** LHRH, tanyocytes, plasticity, median eminence, hypothalamus, proestrus.

Gonadotropin releasing hormone (GnRH) is released into the hypophyseal portal vessels from neuroendocrine terminals localized in the zona externa of the median eminence (ME). GnRH is then transported to the anterior pituitary where it modulates the synthesis and secretion of gonadotropins, which are essential to gonadal function and reproductive success. It is well established that the proestrus surge of GnRH in rat,<sup>12,31,41,48,51</sup> but also in other species<sup>11,37,55,60</sup> provides a neural trigger for the preovulatory luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone surges that, in turn, induces ovulation.<sup>50</sup> The GnRH/LH surge on the after-

noon of proestrus has been, up to now, difficult to link to the pattern of GnRH gene expression.<sup>22,34,36,40,44,45,53,61</sup> The precise relationship between GnRH biosynthesis, GnRH transport into the axons and GnRH release during the estrous cycle is not well defined. Different regulations may occur not only at the cell body level<sup>17</sup> but also at the nerve ending level.<sup>17,24,30</sup> Receptors for different neuro-modulators have been shown in the ME<sup>6,13,15</sup> also local glia have been expected to play a crucial role.<sup>27,32,33</sup> Surprisingly, the mechanism allowing the passage of the GnRH from the nerve terminal into the capillaries of the primary plexus of the hypophyseal portal vessels remains unknown. Indeed, tanyocytes envelop GnRH nerve terminals and prevent, via their end feet, GnRH neurosecretory endings from contacting directly the perivascular space.<sup>27,56</sup> This arrangement seems to be particular

**Abbreviations:** EDTA, ethylenediaminetetra-acetate; FITC, fluorescein isothiocyanate; GnRH, gonadotropin releasing hormone; LH, luteinizing hormone; ME, median eminence; RIA, radioimmunoassay; TBS, Tris-buffered saline.

to GnRH axons, as it has not been observed for nerve endings of other neuroendocrine neurons.<sup>56</sup> Thus, it appears probable that tanyocytes of the ME play a significant role in the regulation of GnRH secretion.<sup>27</sup> Kozłowski and Coates<sup>27</sup> have shown in the male rat, the existence of very rare GnRH terminals contacting directly the perivascular space. These authors predicted that the number of contacts would be greater in the female rat during the afternoon of proestrus or after castration when increased GnRH release occurred. Indeed, a study reveals that gonadectomy induces dynamic transformations of GnRH terminals,<sup>25</sup> suggesting that in experimental conditions a plasticity of the external part of the ME might exist. This plasticity suggests that GnRH nerve endings and/or tanyocytes are able to move under deprivation of gonadal steroids. However, the problem of the existence of a plasticity in physiological conditions remains to be proved. A preliminary study, using confocal microscopy,<sup>26</sup> seems to indicate that modifications of tanyocytes may occur during the estrous cycle. However, taking into account the thickness of most tanyocytic processes separating GnRH nerve endings from the perivascular space, only an analysis at the ultrastructural level of dynamic transformations during this period can give an answer to this question.

Consequently, the present morphological study was carried out at the electron microscopic level and closely examines and compares variations in localization and aspect of individual GnRH terminals in the external zone of ME at the different periods of the estrous cycle and especially during proestrus. Concurrently, periovulatory variations of GnRH contents in neurosecretory nerve endings were analysed in order to determine their respective temporal relationships with well known gonadotropin surges. Our semi-quantification of GnRH at the electron microscopic level was permitted by the use of a colloidal gold (15 nm) postembedding method. Prior to the ultrastructural analysis, the rostrocaudal level of the studied area was defined by light microscopy.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Animals*

Female Wistar rats (200–250 g; CERJ, Paris, France) were maintained on a 14 h light, 10 h dark schedule (lights on at 05.00), with food and water available *ad libitum*. For light microscopy two female rats randomly cycled were used. For the electron microscopic study, estrous cycles were monitored by daily inspection of vaginal cytology. After at least two complete four day cycles, the 37 animals used for the experiment were divided into seven groups, representing different phases of the periovulatory period. The groups were as follows: proestrus 09.00 (eight animals), proestrus 10.00 (six animals), proestrus 13.00 (five animals), proestrus 17.00 (four animals), proestrus 18.00 (six animals), estrus 09.00 (four animals), and diestrus 09.00 (four animals). The groups were chosen to coincide with times when the GnRH release in the portal blood is known to rise (proestrus 13.00–17.00) and reach a peak (proestrus 18.00), and for comparison during the morning on each day of the

cycle (proestrus 09.00, proestrus 10.00, estrus 09.00, diestrus 09.00) when GnRH release is likely maintained at a basal rate.<sup>49</sup> The time points were also chosen to represent cycle stages in which the steroid environment is different:<sup>10</sup> prior to preovulatory estrogen secretion (diestrus 09.00), during preovulatory estrogen secretion (proestrus 09.00–18.00), during the proestrus progesterone surge (proestrus 17.00–22.00), and following the proestrus progesterone surge (estrus 09.00).

The animals were adult rats of 3.5 to four-months-old. This point should be taken into account since previous research has shown that in female rats the mediobasal hypothalamus seems to be mature when animals were at least 40-days-old.<sup>13</sup>

### *Tissue preparation*

**Light microscopy.** Each animal was anaesthetized and transcardially perfused with 900 ml of freshly prepared mixture of 0.2% picric acid, 4% paraformaldehyde, in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The brain with the pituitary attached was dissected and immersed in the same fixative for one additional hour at 4°C. The tissues were then washed overnight in Coons veronal buffer (0.05 M, pH 7.4, 20% sucrose), embedded in Tissue Tek (Miles inc. Diagnostics Division, Elkhart, U.S.A.) and frozen in liquid nitrogen. Sagittal or frontal sections were cut on a cryostat (section thickness 5 µm). The sections were mounted on chrome-alum/gelatin-coated slides and briefly air-dried.

**Electron microscopy.** Animals were decapitated. Hypothalamus were rapidly removed, and fixed by immersion in a mixture of 2% paraformaldehyde, 0.2% picric acid, 0.1% glutaraldehyde, in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 2 h at 4°C. Pieces of tissue were postfixed for 1 h at room temperature with 1% OsO<sub>4</sub> in phosphate buffer, and were embedded in Araldite after dehydration.

Ultrathin sections (80–90 nm-thick) were always taken from the same antero-posterior part of the ME. Semithin sections (1–2 µm-thick) permitted progressively to approach the portion to be studied.

### *Immunocytochemistry staining procedures*

**Light microscopy.** The sections were processed for the immunofluorescence method. The primary antiserum was diluted in a 0.1 M Tris-buffered saline (TBS) containing 1% normal sheep serum and 0.3% Triton X-100. Briefly, sections were incubated overnight at room temperature with rabbit anti-GnRH (1/4000). Antigen-antibody binding sites were visualized using fluorescein isothiocyanate (FITC)-linked sheep anti-rabbit immunoglobulins (Amersham, Les Ulis, France) in a final dilution of 1/200 in Tris-buffered saline as above (90 min at room temperature).

**Electron microscopy: postembedding immunocytochemistry.** Ultrathin sections were treated using the immunogold procedure as previously described.<sup>5</sup> Briefly, after a preliminary treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10%, 8 min) the grids were floated on the following reagents and washing solutions: (i) rabbit anti-GnRH (1/10,000) in TBS (0.1 M; pH 7.4) containing 1% bovine serum albumin, and 1% normal goat serum for 60 h at 4°C; (ii) TBS to remove excess antibodies (3 × 10 min); (iii) colloidal gold (15 nm)-labelled goat anti-rabbit immunoglobulins (Amersham, Les Ulis, France) 1/50 in TBS for 90 min at room temperature; (iv) TBS (3 × 10 min); (v) distilled water (2 × 10 min). The sections were also counterstained with uranyl acetate and lead citrate before observation. Studies on the specificity of the GnRH antiserum have been previously described.<sup>3,7</sup>

As the ultrathin sections from the 37 studied animals were not treated at the same time, two animals were chosen as

GnRH terminals in the median eminence during the estrous cycle

Table 1. Mean ( $\pm$ S.E.M.) number of gonadotropin releasing hormone terminals per 100  $\mu\text{m}$  of basal lamina, and number of gold particles per  $\mu\text{m}^2$  of gonadotropin releasing hormone terminal throughout the estrous cycle

Estrous cycle stages	n	Number of immunoreactive nerve terminals per 100 $\mu\text{m}$ of basal lamina			Number of gold particles per $\mu\text{m}^2$ of nerve terminal		
		d<10	d<5	d<2	d<10	d<5	d<2
Diestrus 09.00	4	13.3 $\pm$ 2.3	6.0 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.5	9.5 $\pm$ 2.0	7.2 $\pm$ 3.2	4.5 $\pm$ 1.0
Proestrus 09.00	8	26.8 $\pm$ 10.0	8.1 $\pm$ 1.8	4.0 $\pm$ 0.9	26.3 $\pm$ 5.4*	22.1 $\pm$ 5.3*	21.0 $\pm$ 5.6*
Proestrus 10.00	6	21.0 $\pm$ 6.0	9.3 $\pm$ 2.2	2.9 $\pm$ 1.0	7.6 $\pm$ 0.8	7.1 $\pm$ 0.4	6.3 $\pm$ 1.4
Proestrus 13.00	5	15.1 $\pm$ 2.9	7.6 $\pm$ 1.3	2.7 $\pm$ 0.5	8.1 $\pm$ 1.8	7.3 $\pm$ 1.3	5.8 $\pm$ 1.3
Proestrus 17.00	4	16.2 $\pm$ 2.6	7.5 $\pm$ 0.7	2.1 $\pm$ 0.7	15.9 $\pm$ 7.1	23.1 $\pm$ 16.5	8.62 $\pm$ 2.1
Proestrus 18.00	6	45 $\pm$ 11.7**	15.5 $\pm$ 3.9	5.8 $\pm$ 2.0	15.7 $\pm$ 2.4**	13.8 $\pm$ 2.9**	13.1 $\pm$ 2.3**
Estrus 09.00	4	14.6 $\pm$ 2.3	6.5 $\pm$ 0.7	2.6 $\pm$ 0.4	7.2 $\pm$ 1.8	6.5 $\pm$ 1.5	5.2 $\pm$ 1.4

The analysis is led at the 10  $\mu\text{m}$  (d<10), 5  $\mu\text{m}$  (d<5), 2  $\mu\text{m}$  (d<2) intervals from the basal lamina.

\*significant difference ( $P<0.05$ ) between proestrus 09.00 and diestrus 09.00, proestrus 09.00 and proestrus 10.00.

\*\*significant difference ( $P<0.05$ ) between proestrus 18.00 and proestrus 13.00, proestrus 18.00 and estrus 09.00.

controls and were added in each immunocytochemical manipulation in order to verify the reproducibility of the technique.

*Quantitative analysis*

The morphometric analysis was carried out blindly on electron microphotograph montages of immunostained ultrathin sections that included the whole ME. Two montages of 30–40 microphotographs of the largest field of the ME external zone were made per animal ( $n=37$ ) from ultrathin sections separated from 10  $\mu\text{m}$  each other. The photographs were taken at an original magnification of 7000 $\times$ ; they were further magnified to 21,000 $\times$  by printing.

*Measures.* For each of the montages, made of 1.5–4 m of length, we counted the number of immunostained GnRH terminals. The work was confined to a distance of 10  $\mu\text{m}$  or less from the basal lamina. For each of the GnRH-labelled nerve endings, we measured: i) the sectioned area, ii) the number of gold particles, and iii) the minimum distance between the nerve terminal membrane and the parenchymatous basal lamina. On estrous ( $n=4$ ), diestrus ( $n=4$ ) and proestrus ( $n=29$ ) female rats, a total of 194, 139 and 1554 immunoreactive terminals were analysed, respectively. In each montage we also counted the number of non-immunoreactive terminals in contact with the basal lamina. A cartographer's wheel was used to measure the length of the parenchymatous basal lamina. The sectioned area of each nerve terminal was measured manually with graph paper.

*Exploitation of results.* The number of immunoreactive terminals counted in a photomontage were divided by the basal lamina length (contained between 107 and 349  $\mu\text{m}$ ) and multiplied by 100 to obtain the number of immunoreactive terminals per 100  $\mu\text{m}$  of basal lamina. The same procedure was used to calculate the number of non-immunoreactive terminals in contact with the basal lamina per 100  $\mu\text{m}$  of basal lamina. The number of gold particles per  $\mu\text{m}^2$  of nerve terminal was considered to be proportional to the GnRH content and was consequently used for the semi-quantification of this neuropeptide. Finally, the values obtained from the two photomontages per animal were averaged and in the different groups the data (distance to the basal lamina, number of immunoreactive terminals per 100  $\mu\text{m}$  of basal lamina, number of gold particles per  $\mu\text{m}^2$  of nerve terminal, and number of non-immunoreactive terminals in contact with the basal lamina per 100  $\mu\text{m}$  of basal lamina) were expressed as mean ( $\pm$ S.E.M. for  $n$  animals) (Tables 1, 2, Figs 6, 7). A Mann–Witney<sup>35</sup>  $U$ -test was performed on Sigmastat (Jandel Scientific) for statistical

Table 2. Relation between the content of gold particles in immunostained nerve endings and the number of immunolabelled terminals

Number of gold particles per $\mu\text{m}^2$ of nerve terminal	n	Number of GnRH terminals per 100 $\mu\text{m}$ of basal lamina
<14	26	18 $\pm$ 2
>14	11	43 $\pm$ 11

Our quantification studies showed that the increase in number of immunolabelled GnRH terminals is parallel to the increase in gold particle content ( $P<0.03$ ).

analysis. Differences between two groups were considered as significant when the  $P$  value was inferior to 0.05.

Quantification analysis of the control animals permitted us to verify the reproducibility of the immunostaining procedure and of the counting: intra-experiment and inter-experiment variabilities with regard to the number of immunoreactive terminals per 100  $\mu\text{m}$  of basal lamina were 4.4% and 9.6%, respectively, and with regard to the number of gold particles per  $\mu\text{m}^2$  of nerve terminal were 8.8% and 16.6%, respectively.

*Radioimmunoassays*

After decapitation, to verify the physiological stage of each animal, trunk blood was collected into vials containing 0.5 ml of 0.3 M EDTA and centrifuged. Plasma were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until LH, estrogen, and progesterone radioimmunoassay (RIA).

Plasma LH levels were measured using materials supplied by the NIDDK rat pituitary hormone distribution program (Baltimore, MD) and values expressed in terms of the LH pituitary reference preparation RP3. Assay sensitivity was 0.02 ng/tube, and intra-assay and inter-assay variances were 6% and 8.5%, respectively.

Plasma estradiol was measured using a RIA kit optimized for the direct quantitative determination of very low concentrations of 17 $\beta$  estradiol in human serum and plasma (e.g., in children), purchased from SORIN Biomedica (Antony, France). Assay sensitivity was 0.2 pg/tube and intra-assay and inter-assay variances were 5.6% and 7.3%, respectively.

Progesterone levels were measured in plasma samples without extraction, using a RIA kit purchased from SORIN Biomedica (Antony, France). Assay sensitivity was 5 pg/tube and intra-assay and inter-assay variabilities were 5.5% and 8.1%, respectively.

## RESULTS

*Light microscopic analysis: determination of the area of electron microscopic study*

GnRH immunolabelling of the ME was observed at different antero-posterior levels in light microscopy. The rat ME extended over 2.5 mm from the most rostral to the most caudal part (Fig. 1A). GnRH immunoreactivity was very intense posterior to the x section (Fig. 1A), in the dorsolateral part of the ME (Fig. 1B); at y (Fig. 1C), the pituitary stalk just became distinct from the base of hypothalamus but still remained attached by tissue including capillaries of the hypophyseal portal vascular system. At this level the immunoreaction was still very intense and similar to the labelling observed in the dorso-lateral part of ME (x cutting plan) where studies were usually made. After the y, the GnRH immunoreactivity decreased very rapidly (Fig. 1A).

The electron microscopy study was carried out at the y level (Fig. 1A, C). Indeed, the y level can be easily spotted and constitutes a landmark for each animal strongly immunostained by anti-GnRH antibodies. Ultrathin sections were taken in each animal exactly in this same antero-posterior part of median eminence (within about 20  $\mu\text{m}$ ) permitting a good comparison between each animal.

*Immunocytochemistry observations at the electron microscopy level*

As expected, the external zone of the ME, selected for the present study exhibited a high number of labelled nerve endings. In our experimental conditions, colloidal gold particles representing GnRH immunoreactivity were observed exclusively in nerve endings. The labelling was observed on some large dense-core secretory granules, but also in axoplasm and mitochondria (Fig. 2). All other cellular elements, including immediately adjacent terminals, tanycytes, and capillaries, showed in most cases no labelling (Figs 2, 3). Observations of serial sections, only used to verify the specificity of the labelling, indicated that the GnRH immunostaining could be considered as specific when at least three 15 nm gold particles were found in a medium-sized nerve terminal (about 1.6–2  $\mu\text{m}^2$ ) (Fig. 3). At every stage of estrous cycle, many GnRH nerve terminals were frequently observed in immediate proximity to the fenestrated capillaries, but they were mostly separated from the parenchymatous basal lamina by tanycytic processes of variable thickness (Fig. 2). In some cases, GnRH nerve endings appeared to be included within tanycytes (Fig. 2A), whereas, in other cases, a slight space between two plasmatic membranes of tanycytic end feet seems to form a passage from the nerve terminal to the pericapillary space (Fig. 2B). Only at the day of proestrus, direct contacts between GnRH nerve endings and basal lamina of the pericapillary space were observed (Fig. 4).

Apparently different types of contact were observed on single ultrathin sections: most of them were established on a small surface of the axoplasmic membrane (Fig. 4A–C). In many cases, single GnRH neuroendocrine terminals presenting a long process were observed in contact with the basal lamina (Fig. 4A). Conversely, evaginations of the basal lamina towards GnRH nerve terminals were frequently observed. In some cases the observation of serial ultrathin sections showed that the evaginations sometimes contact nerve terminals (Fig. 5B). Finally some contacts were observed on a large surface of axoplasmic membranes but they were very rare (Fig. 4D).

*Quantitative analysis*

The analysis was carried out at the 10  $\mu\text{m}$  ( $d < 10$ ), 5  $\mu\text{m}$  ( $d < 5$ ), and 2  $\mu\text{m}$  ( $d < 2$ ) intervals from the basal lamina and the results detailed on Tables 1, 2.

*Distance.* The average distance of immunolabelled nerve terminals from the basal lamina did not significantly vary either as a function of estrous cycle stages, or as a function of proestrous hours. This average distance was  $5.32 \pm 0.14 \mu\text{m}$  ( $n=37$  animals).

*Size.* The average surface of GnRH terminals did not significantly vary either as a function of estrous cycle stages, or as a function of proestrous hours ( $d < 10 \mu\text{m}$ , average area:  $1.6 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$ ). This study, however, allowed us to observe that the surface of individual nerve boutons was greater when they came near to the basal lamina ( $d < 5 \mu\text{m}$ , average surface:  $2.1 \pm 0.2 \mu\text{m}^2$ ;  $d < 2 \mu\text{m}$ , average surface:  $2.9 \pm 0.3 \mu\text{m}^2$ ; U-test,  $d < 5$  vs  $d < 2$ :  $p < 0.05$ ;  $d < 10$  vs  $d < 2$ :  $P < 0.0001$ ).

*Number of immunodetected terminals.* The number of immunoreactive terminals per 100  $\mu\text{m}$  of basal lamina rose dramatically between 13.00 and 18.00 of proestrus ( $P < 0.05$ , Table 1, Fig. 6) for the terminals confined to a distance of 10  $\mu\text{m}$  from the basal lamina.

*Content of gonadotropin releasing hormone.* When considering the terminals confined to a distance of 10  $\mu\text{m}$  from the basal lamina, the number of gold particles detected in immunoreactive terminals varied on the day of proestrus (Table 1, Fig. 7). The number of gold particles per  $\mu\text{m}^2$  of terminal was greatest at 09.00 of proestrus and fell dramatically at 10.00 of proestrus ( $P < 0.03$ ; Fig. 8). The number of gold particles per  $\mu\text{m}^2$  reached a new peak at 18.00 of proestrus ( $P < 0.01$ ). When considering GnRH terminals at 5  $\mu\text{m}$  and 2  $\mu\text{m}$  intervals from the basal lamina these two peaks of GnRH content were also significant.

GnRH terminals in the median eminence during the estrous cycle

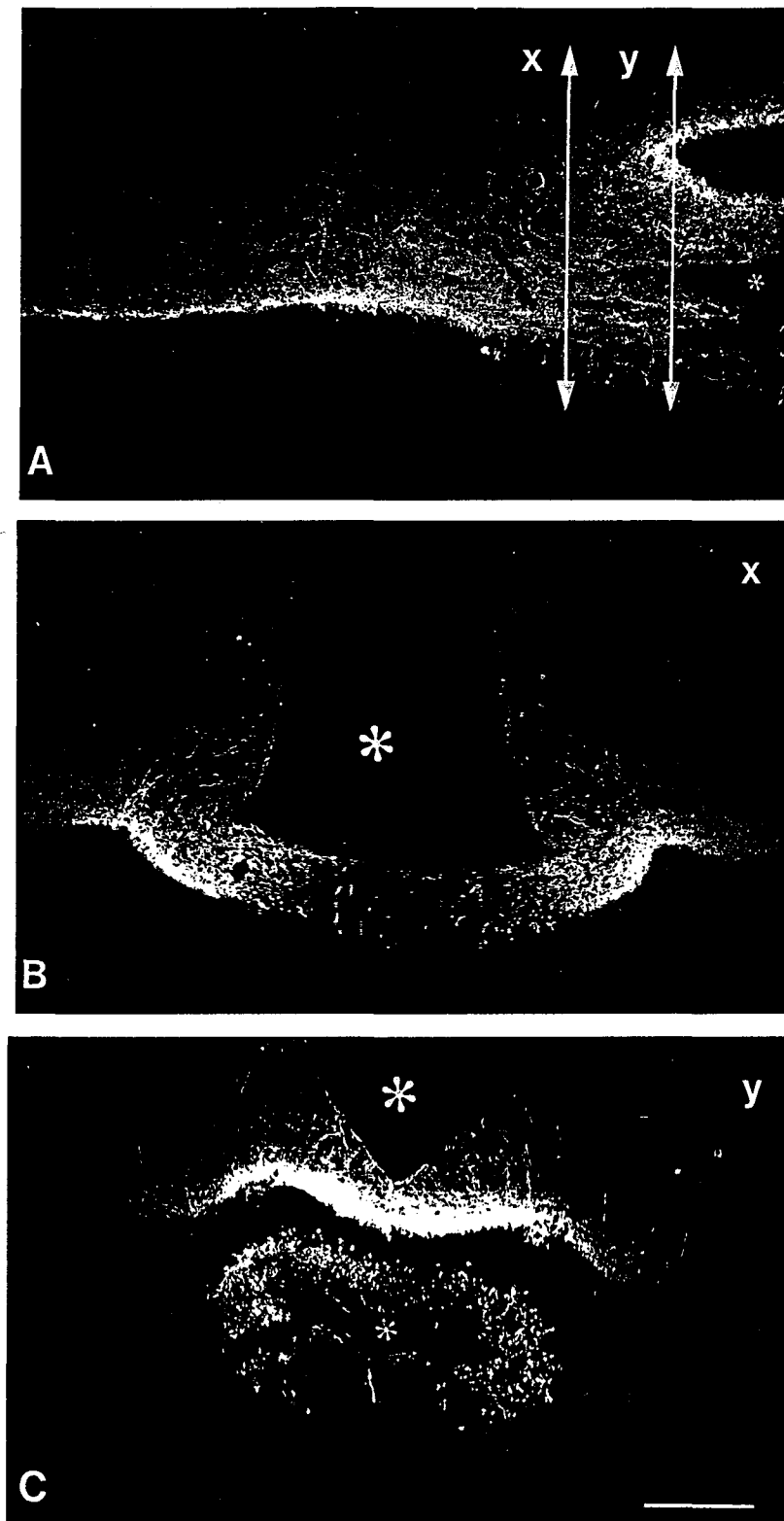


Fig. 1. Light microphotographs obtained from parasagittal (A) and coronal (B-C) sections of female rats hypothalamus including the median eminence. (A) The arrow *x* allows to localize the cutting plan of B while arrow *y* corresponds to C. The immunostaining for GnRH (FITC) is visible in the external zone of the ME. In the plane of C which can be easily spotted, the reaction is at least as intense as in B. \*Third ventricle; Scale bar=200  $\mu$ m.



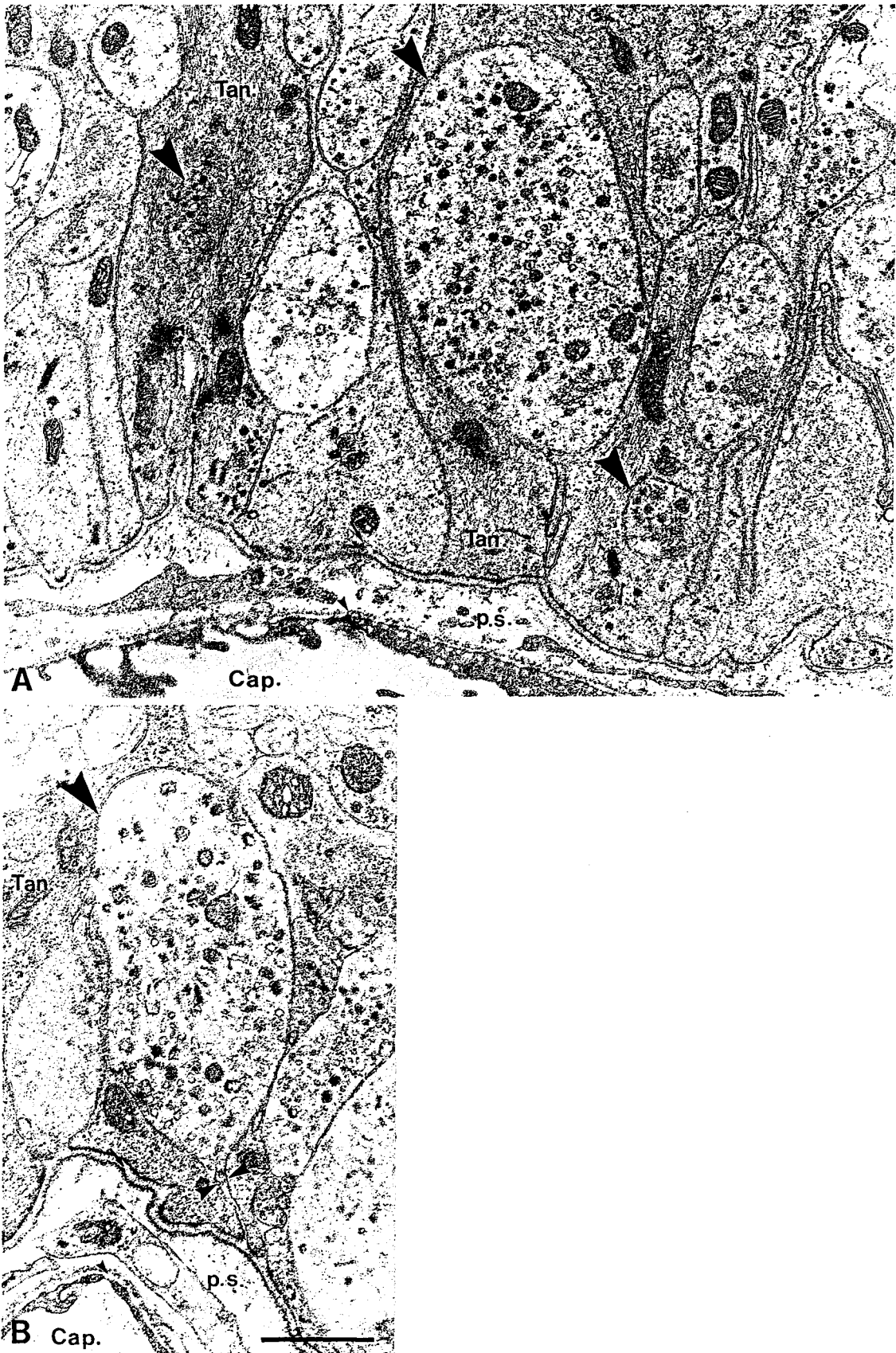


Fig. 2. Electron micrographs of GnRH-immunoreactive terminals (large arrowhead) localized in the external zone of ME of female rats at immediate proximity of fenestrated capillaries (cap.). GnRH terminals (large arrowheads) are separated from the parenchymatous basal lamina (little arrow) by tanyctic processes (Tan.) and seem in some cases included in the ependymal process (A-B). Occasionally a slight space between two plasmatic membranes of tanyctic end feet (medium-sized arrowheads) suggests possibilities of passage from the nerve terminal to the pericapillary space (p.s.) (B). Little arrowhead, endothelial basal lamina. Scale bar=1  $\mu$ m.

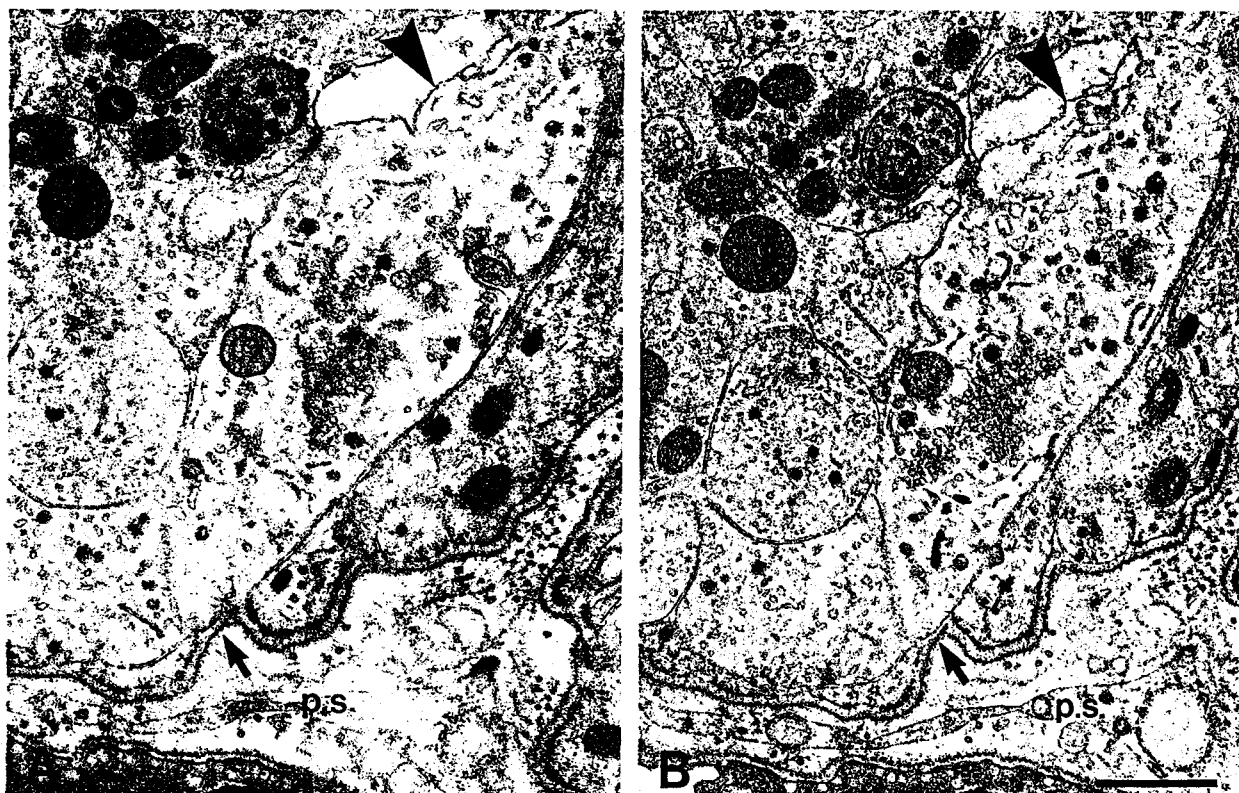


Fig. 3. Adjacent ultrathin sections (A, B) incubated with anti-GnRH. In this example, the nerve terminal (arrowhead) in contact with the basal lamina (arrow) shows GnRH immunoreactivity on both adjacent sections while no background is present. Such observations have permitted to see that the presence of only three gold particles in the nerve ending is sufficient to characterize the terminal as a GnRH one. p.s., pericapillary space. Scale bar=0.5  $\mu$ m.

*Number of terminals as a function of neuropeptide content.* A relation between the number of immunoreactive terminals and the number of gold particles per  $\mu$ m<sup>2</sup> of terminal was established (Table 2). All the animals studied ( $n=37$ ) were grouped into two populations. The mean value of gold particles per area of nerve ending (14 particles/ $\mu$ m<sup>2</sup>) was chosen as the cut-off value. A first population was established when the mean values of gold particles was greater than 14 particles/ $\mu$ m<sup>2</sup>. A second was established when the mean values of gold particles was less than 14 particles/ $\mu$ m<sup>2</sup>. In the first population the number of immunodetected terminals was significantly higher than in the second population (Table 2,  $P<0.03$ ). Thus, it appears that the number of immunoreactive terminals observed was significantly linked to their content of GnRH.

*Number of non-immunoreactive terminals apposed to the basal lamina.* Some unlabelled terminals were observed in contact with the basal lamina. The number of unlabelled terminals in contact with the basal lamina per 100  $\mu$ m of basal lamina ( $5.3 \pm 0.7$  terminals,  $n=37$ ) did not vary significantly throughout the estrous cycle.

#### *Preovulatory hormone secretions*

Average plasma LH, estrogen, and progesterone levels as determined by RIA were typical for all of the estrous cycle time points that were examined (Fig. 9). The LH levels remained low ( $0.80 \pm 0.08$  ng/ml) between diestrus 09.00, and proestrus 13.00 and they reached values typical for the apex of the LH surge ( $14 \pm 2$  ng/ml) at proestrus 18.00. After 18.00 on proestrus, LH levels fell dramatically and returned to baseline values ( $0.42 \pm 0.09$  ng/ml) by estrus 09.00. Average estrogen levels were very high the day of proestrus, reached a peak at 09.00 ( $61.9 \pm 8.8$  pg/ml) and fell at 10.00 ( $36.1 \pm 4.5$  pg/ml,  $P<0.05$ ). At 13.00 on proestrus estrogen levels ( $60.5 \pm 12.0$  pg/ml) seemed to reach a new peak. The estrogen levels completely returned to baseline values by estrus 09.00 and diestrus 09.00 ( $4 \pm 2$  pg/ml). These results are in accordance with those of Butcher *et al.*<sup>10</sup> Average progesterone levels reached two peaks during the estrous cycle. As shown previously<sup>10</sup> the first peak occurs during the afternoon of metestrus and morning of diestrus ( $47.3 \pm 5.5$  ng/ml at diestrus 09.00). The second peak occurs during the late afternoon of proestrus ( $38.5 \pm 8.4$  ng/ml at proestrus 18.00).

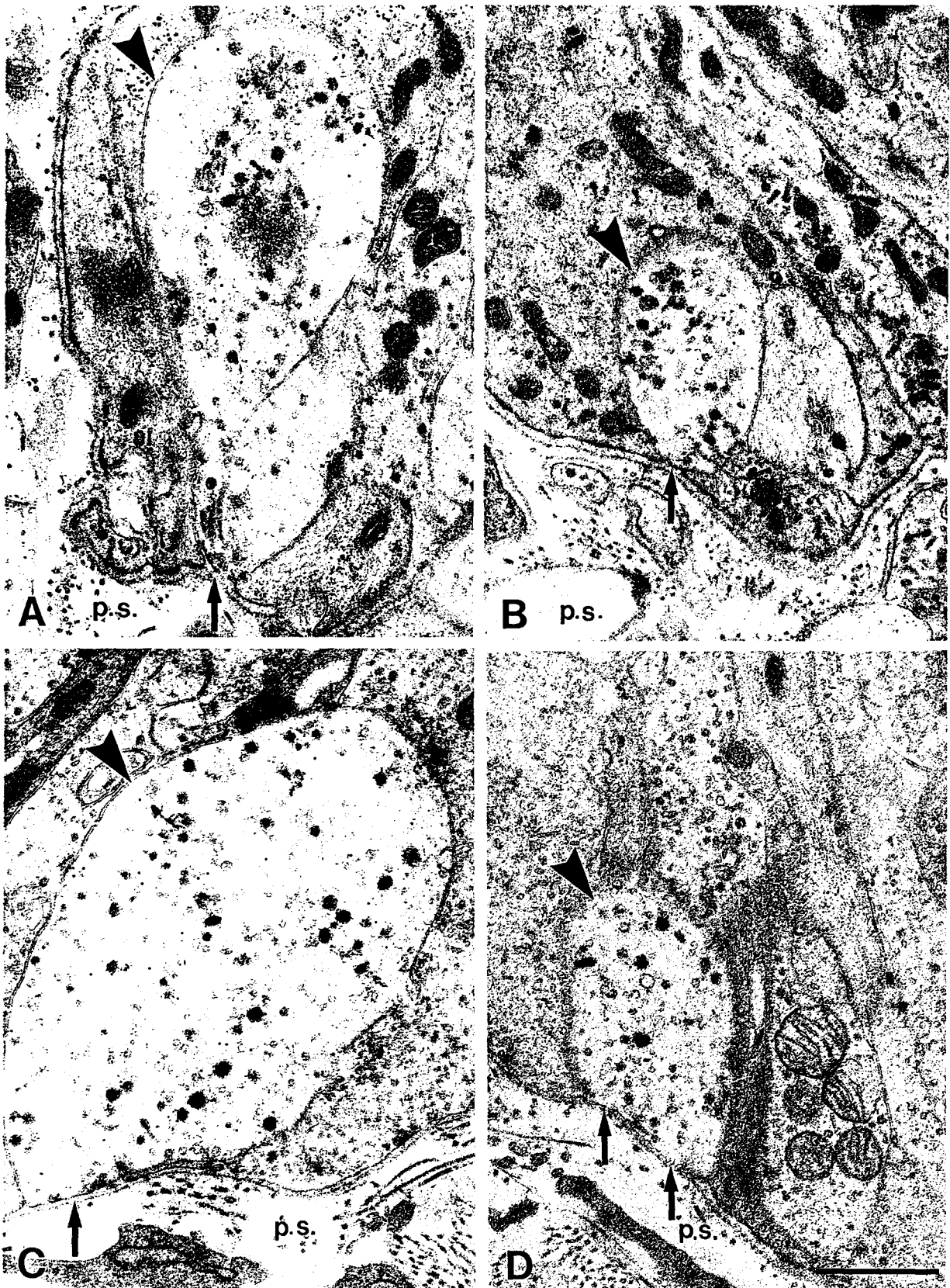


Fig. 4. Electron micrographs of ultrathin sections showing the different types of contacts (arrow) observed between GnRH-immunoreactive nerve terminals and the parenchymatous basal lamina the day of proestrus. The majority of them were established on a small surface of the axoplasmic membrane (A-C). Some GnRH neuroendocrine terminals (arrowhead) (A) presents a long process making contact with the basal lamina: in the present illustration some gold particles are visible in the process. Contacts were sometimes established on a large surface (D) of axoplasmic membrane but such observations are rare. p.s., pericapillary space. Scale bar=1  $\mu$ m.

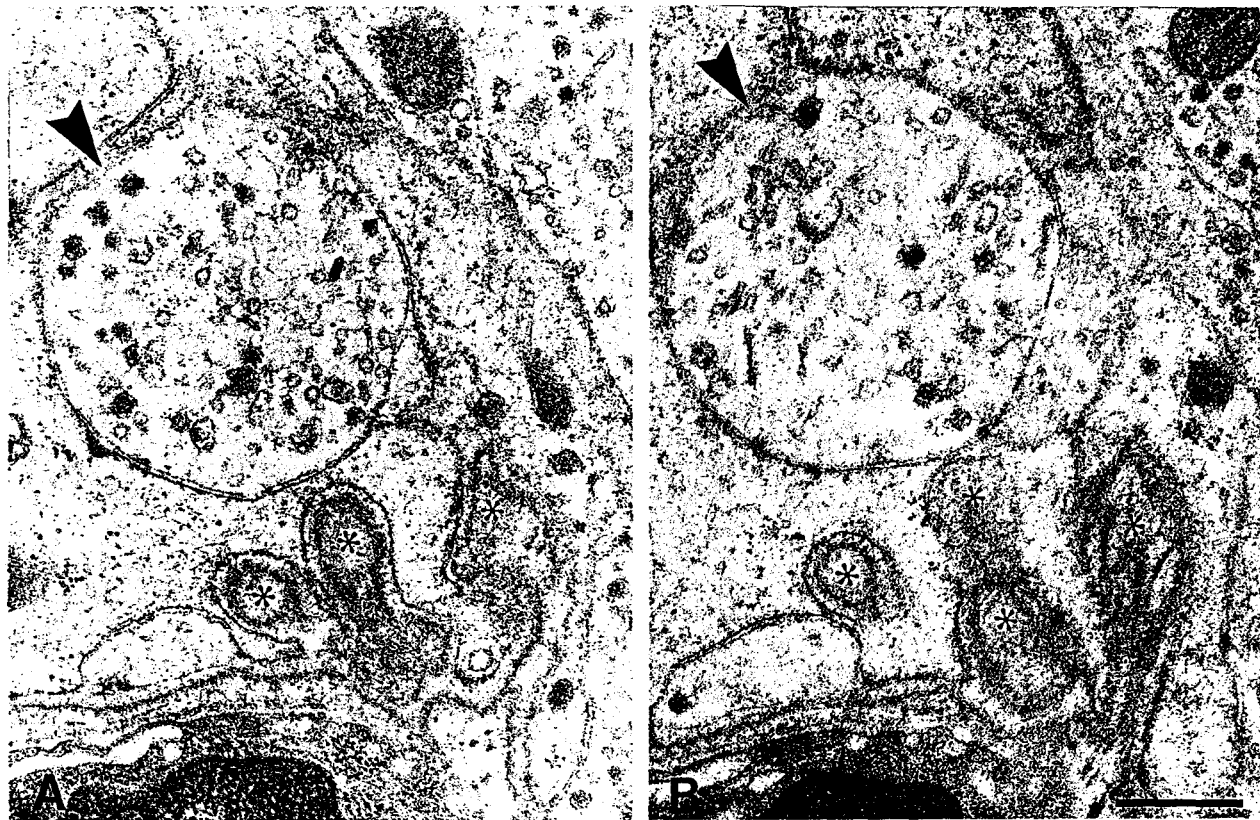


Fig. 5. Example of result obtained from serial ultrathin sections (A, B). A same GnRH-immunoreactive nerve terminal (arrowhead) is detected on both sections. An evagination of the parenchymatous basal lamina (\*) is pointed towards the GnRH terminal in (A) and comes in contact in (B). Scale bar=0.5  $\mu$ m.

#### DISCUSSION

##### *Methodological considerations*

The morphological study of the external zone of ME during the estrous cycle seems possible using two major approaches: confocal microscopy and electron microscopy. In fact, many arguments led us to use electron microscopy. Given the very slight thickness of some tanyctic processes separating GnRH nerve endings from the basal lamina, it seems difficult to visualize them using confocal microscopy. Moreover, in confocal microscopy, anti-vimentin antibodies are often used to differentiate tanyctes,<sup>16</sup> but in fact, when this immunostaining is observed at the electron microscopic level (personal observation) the very thin processes are rarely labelled. This led us to think that thin processes cannot be observed using confocal microscopy. Therefore, a study of neuropeptidergic content of nerve terminals is almost impossible at the confocal microscopic level, while at the electron microscopic level, if the necessary controls and precautions are observed, the use of a postembedding immunogold procedure allows a precise semi-quantification of GnRH nerve ending contents. Consequently, we have chosen the electron microscopic approach to evaluate: first, the possible periovulatory variation of the distance between the GnRH

terminals and the parenchymatous basal lamina, and second, the content of GnRH in the nerve terminals. A direct link should exist between the number of gold particles and the number of GnRH molecules present in a neurosecretory immunolabelled nerve ending, since no signal amplification was used during the immunocytochemical procedure. As previously mentioned, the study of GnRH content of nerve terminals is semi-quantitative. A loss of GnRH molecules may occur during the inclusion procedure, but this loss is homogenous for all the populations studied because each brain was submitted to a strictly identical inclusion procedure. Finally, in each immunocytochemical experiment two control animals were added making it possible to verify the reproducibility of the technique. To date, a majority of authors<sup>25,27,52,56</sup> have used the pre-embedding immunocytochemistry technique to study GnRH nerve endings in the external zone of ME. This technique may have a better sensitivity to detect GnRH pre-terminals or terminals than postembedding immunocytochemistry procedure but presents some drawbacks: (i) the necessity of making Vibratome slices which often creates some problems in preservation, (ii) the conservation of membranes may be altered by the use of detergent often necessary to strengthen the antibody penetration, (iii) antibodies

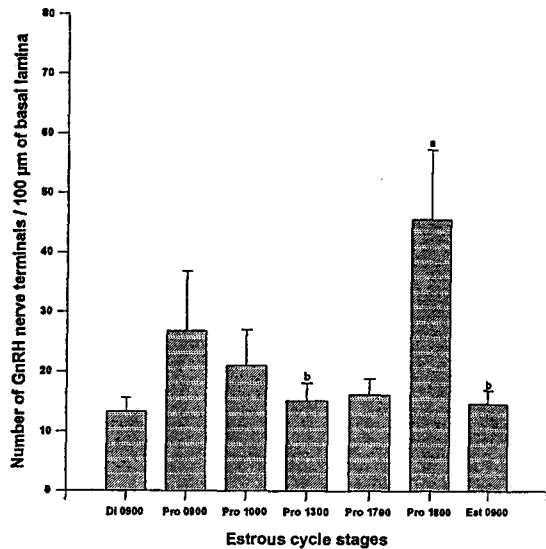


Fig. 6. Changes in the number of immunoidentified GnRH nerve terminals per 100  $\mu\text{m}$  of basal lamina throughout the estrous cycle. Note the maximum number of immunoreactive GnRH nerve terminals at 18.00 proestrus (Pro) (a versus b,  $P < 0.05$ ).

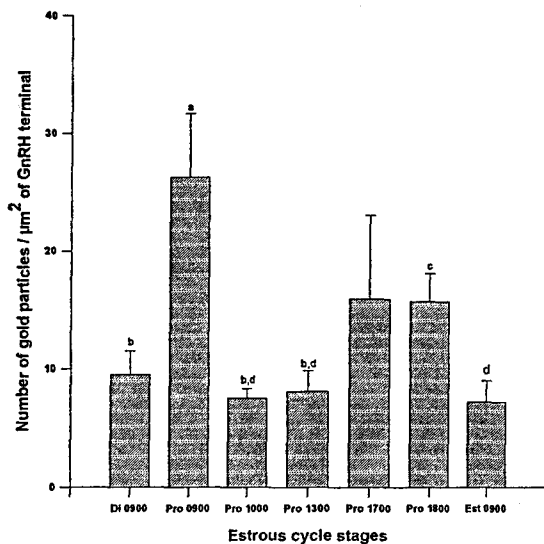


Fig. 7. Changes in the number of gold particles per  $\mu\text{m}^2$  of GnRH terminal throughout the estrous cycle. Significant differences ( $P < 0.05$ ) among average values in different groups are noted as a versus b, and c versus d. As illustrated in Fig. 8, higher concentrations of gold particles are observed the day of proestrus: first at proestrus 09.00, far before the start of GnRH/LH surge, second at proestrus 18.00 during GnRH/LH surge.

are visualized with 3,3'-diaminobenzidine and the precipitate obtained is often diffuse and always unquantifiable.

The choice of a caudal antero-posterior plane in our study offers two advantages: (i) the possibility of making a true comparison between animals (see Experimental Procedures), (ii) the existence of high immunostaining. Moreover, caudal ME has been

shown to be more involved in the adenohipophysis regulation than rostral ME.<sup>2</sup>

#### Morphological considerations

This work clearly shows that contacts between GnRH terminals and the parenchymatous basal lamina exist at proestrus. Existence of such contacts suggests that GnRH can pass directly in the lumen of fenestrated capillaries of portal blood vessels. Even if this notion is commonly admitted<sup>23,25,27,39,59</sup> the evidence of contacts have never been positively demonstrated. Kozlowsky *et al.*<sup>27</sup> have shown one microphotograph of an apposition between a GnRH terminal and the basal lamina in the male rat, using a 3,3'-diaminobenzidine pre-embedding immunocytochemistry method. These authors were, however, surprised by the great rarity of such images and predict that the number probably varies in the female according to the level of ovarian steroids during the estrous cycle and might be higher during proestrus. In fact, in our study using female rats, we have clearly demonstrated that contacts could be visualized only during proestrus. In the great majority of cases, GnRH terminals are still separated from basal lamina by tanyctic end feet. Even when the contacts exist, they are very often difficult to observe since they occur on a very small surface. The absence of observations of contacts during the diestrus and the estrus might be related with nadir GnRH levels measured in portal blood at these stages.<sup>49</sup> Indeed, the number of immunolabelled nerve endings apposed to the basal lamina may be even fewer at these stages and therefore the probability to detect them becomes very small. The morphometric analysis did not show a variation of the average distance between GnRH terminals and capillaries throughout the estrus cycle. Therefore, our results, obtained in physiological conditions, are different to results obtained in a previous experimental work.<sup>25</sup> King and Letourneau<sup>25</sup> have shown that the distance separating GnRH nerve endings from capillaries varied significantly as a function of both sex and time after gonadectomy. Thus, it appears that contrary to castrations, in physiological conditions and at the level of the hour, the existence of important neuroplastic changes in the GnRH apparatus cannot be observed in the external part of the ME. Our findings are also in direct disagreement with a preliminary observation<sup>26</sup> using confocal microscopy, suggesting the existence of large plastic changes of tanyctes and GnRH terminals the day of proestrus. The plastic changes observed by the authors may be due, not to tanyctic process movements but to a steroid-dependent expression and distribution of the molecule used to differentiate tanyctes, whereas the tanyctic end feet themselves, as shown by our results, might not significantly move. Our personal observations made at the ultrastructural level have shown that anti-vimentin antibodies, often used to



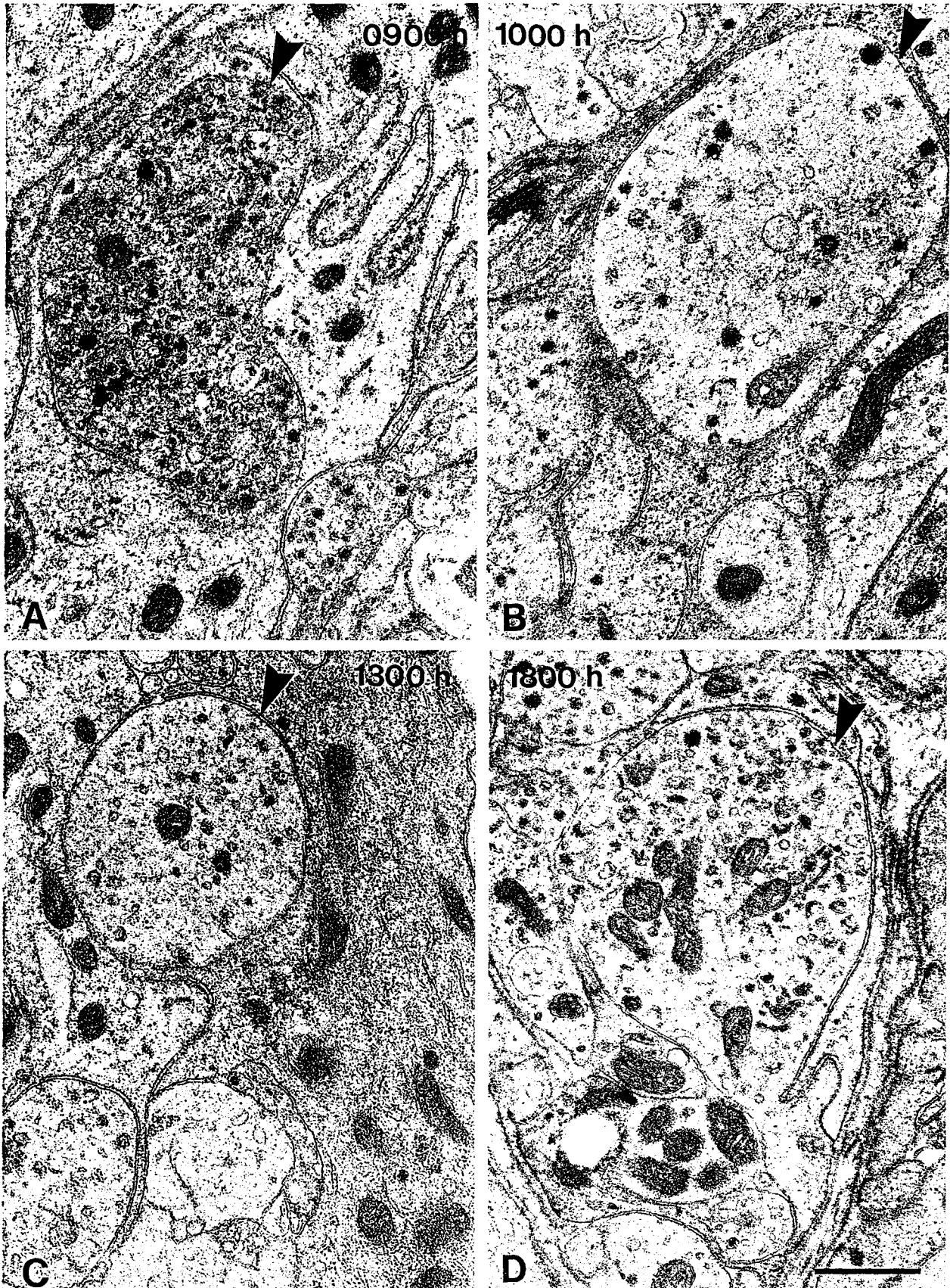


Fig. 8. Electron micrographs of GnRH-immunopositive terminals from female rats killed on 09.00 proestrus (A), 10.00 proestrus (B), 13.00 proestrus (C) and 18.00 proestrus (D). The number of gold particles in GnRH nerve terminals is higher at 09.00 (A) and 18.00 proestrus (D) than at 10.00 (B) and 13.00 proestrus (C). Scale bar=0.5  $\mu$ m.

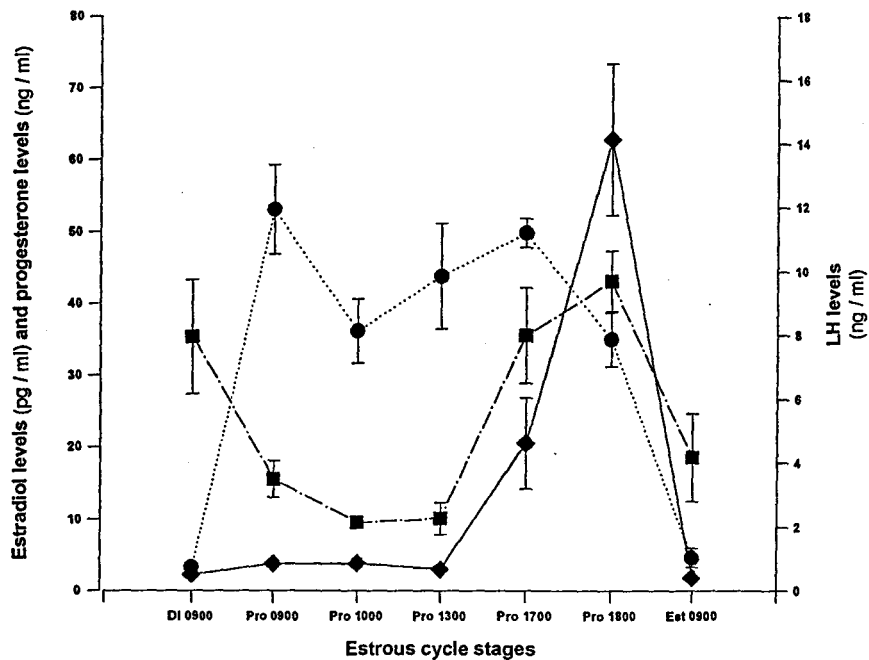


Fig. 9. Mean concentrations of plasma LH ( $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$ ), estradiol ( $\bullet$ — $\bullet$ ), and progesterone ( $\blacksquare$ — $\blacksquare$ ) in rats killed at different estrous cycle stages. Vertical bars indicate  $\pm$  S.E.M.

differentiate tanycytes at the light microscopic level, do not label all thin tanycytic processes. However, we cannot rule out that the neuroglial plastic changes might take place very rapidly (on a 10 min scale) explaining our statistical absence of variations when observations are made every hour. In this case, these rapid changes would appear very different from the synaptic remodelling observed in the rat arcuate nucleus during the estrous cycle, which takes place in 48 h for a complete cycle of denervation and reinnervation of neurons.<sup>38</sup>

Even if our findings are not in favour of the existence of large neuroglial plastic changes in the GnRH apparatus at the level of the hour, the existence of a slight plasticity can not be excluded. Indeed, the fact that contacts are only observed in proestrus plus the fact that long processes emerging from GnRH terminals towards the basal lamina or, conversely that evaginations of this latter toward GnRH nerve endings are frequent, suggest the existence of reciprocal attractions between the two structures and lead to the notion of slight plasticity. This notion implies that some tanycytes are able to move very slightly permitting GnRH terminals or more probably to thin processes emerging from GnRH terminals to access to the basal lamina. A cytoskeleton remodelling of tanycytes could permit this phenomenon. The hypothesis of the existence of a slight neuroglial plasticity in the external zone of ME is supported by the fact that the expression of the polysialylated isoform of neural cell adhesion molecule persists in adult animals at the level of this brain area.<sup>8</sup> The presence of this molecule has been proposed as a marker for neuronal and/or glial

plasticity in adult systems.<sup>54</sup> The slight plasticity of tanycytes might be induced directly by steroids, since estrogen receptors seem to be expressed in these ependymal cells.<sup>28</sup> In addition we cannot rule out that other substances might act on tanycytes via a paracrine mechanism. This last hypothesis can be supported by the presence of opioid receptors or specific peptidases on tanycyte membranes.<sup>6,13,57</sup>

In our study, the number of GnRH-immunoreactive terminals varies during the estrous cycle. The statistical analysis shows that the increase in the number of immunoreactive nerve endings is paralleled by a general increase in GnRH content. These findings suggest that the increase in number is essentially linked to the variation of the GnRH content in the nerve terminals of the ME throughout the estrous cycle. In fact, it is probable that nerve endings containing GnRH under the threshold of immunodetection in certain periods of the estrous cycle only become detectable when GnRH content increases. Thus, among unlabelled terminals observed in apposition with the basal lamina, some could belong to the GnRH apparatus but are under the threshold of immunodetection. Otherwise, variations in the distance between immunolabelled GnRH nerve endings and basal lamina observed in gonadectomized animals<sup>25</sup> may be due, not exclusively to different factors locally produced and having a direct action as proposed by some authors,<sup>25</sup> but also to variations of GnRH content in nerve endings. This hypothesis is strengthened by the fact that after gonadectomy, the shorter distances measured for GnRH terminals and the basal lamina are correlated with an increase in LH secretion. This increase is observed both in males

and females and consequently with an enhanced activity of the GnRH axis which may lead to an increase in GnRH content and thus, to an increase in the GnRH immunodetection at the ME level.

#### *Gonadotropin releasing hormone immunoreactivity quantification*

Our semi-quantitative results obtained at the electron microscopic level demonstrate that content of GnRH in individual terminals varies throughout the estrous cycle and particularly during proestrus. It should, however, be mentioned that in a previous work, made at the light microscopic level, no differences were observed.<sup>46</sup> In fact the comparison of the two results is difficult since, in addition to differences in the approach, the age and portion of the ME which was analysed were also different.<sup>46</sup>

Our results strikingly demonstrate that the neuropeptide content in the GnRH nerve endings is characterized by a peak on the day of proestrus at 09.00, then decreases, with a second peak at 18.00. Concerning the peak at 18.00, our findings are in accordance with many studies that have shown a peak of GnRH in the portal blood<sup>12,20,41,48,51</sup> or in the mediobasal hypothalamus<sup>1,31,42</sup> at 18.00 of proestrus, using a RIA approach. For the peak of 09.00, some authors have made measures in the morning of proestrus. However, the present results are in accordance with a previous study of Araki *et al.*,<sup>1</sup> showing that GnRH content of the mid-hypothalamic regions significantly increased at 08.00 of proestrus and decreased at 11.00 and 14.00, together with the fact that at 09.00 proestrus, electrical stimulation of the medial preoptic area very significantly increases the GnRH content of pituitary stalk plasma.<sup>19</sup> Our ultrastructural immunocytochemical observations with the results of Araki *et al.*<sup>1</sup> are in favour of a GnRH secretion both the morning and the afternoon of proestrus.

The existence of a little spontaneous GnRH release without repercussion on LH plasmatic levels, as observed in our results, is in accordance with a previous work showing that the responsiveness of the anterior pituitary to GnRH stimulation is as low at 10.00 on proestrus as the days of estrus and diestrus.<sup>14</sup> The role of this little spontaneous portal GnRH release the morning of proestrus remains to be established. Bauer-Dantoin *et al.*<sup>4</sup> have demonstrated that GnRH receptor mRNA levels in the pituitary change dramatically between 09.00 and

12.00 on proestrus. Indeed, within 3 h, GnRH receptor mRNA levels increase to values that are three-fold greater than those observed at 09.00 on diestrus. This increase precedes the preovulatory LH surges by approximately 6 h, and occurs 3 h after significant elevation in serum estradiol levels.<sup>4</sup> It can be hypothesized that the GnRH release occurring the morning of proestrus may participate in triggering GnRH receptor gene expression in gonadotrophs and can thus have a self-priming effect by increasing pituitary responsiveness to GnRH<sup>18,21</sup> which is maximal at 13.00 proestrus.<sup>14</sup>

At 18.00 proestrus, it is interesting to note that the high concentrations of GnRH in nerve endings are concomitant, first with high concentrations of GnRH in the portal blood, second with a peak in the number of GnRH mRNA expressing neurons in the anterior hypothalamus<sup>40,43</sup> and third with the greatest number of GnRH neurons expressing Fos.<sup>9,29,47,58</sup> Altogether, these data suggest that at 18.00 proestrus, the activity of GnRH synthesis in cells is so intense that neuropeptide stores in the nerve endings of the ME are constantly fully replenished in spite of GnRH massive release.

#### CONCLUSION

The present data are not in favour of the existence of a large neuroglial plasticity in physiological conditions in the external zone of median eminence for the GnRH apparatus. Indeed, conversely to what other works had predicted or suggested, GnRH nerve endings in contact with pericapillary spaces remain very rare, even during proestrus, and, tanyctic processes do not move significantly. Our ultrastructural observations show the existence of changes of GnRH content in nerve endings during proestrus with two peaks, first at 09.00 and second at 18.00. Variations in the number of immunopositive terminals follow variations in individual content of terminals. Taking into account our results, the existence of a slight and/or rapid plasticity should not, however, be excluded but remains to be investigated.

*Acknowledgements*—The authors would like to thank Mrs G. Mortreux for her excellent technical assistance in radioimmunoassays realisation and the NIADDK for the rat LH RIA material.

#### REFERENCES

1. Araki S., Ferin M., Zimmerman E. A. and Vande Wiele R. L. (1975) Ovarian modulation of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) in the rat brain: evidence for a differential effect on the anterior mid-hypothalamus. *Endocrinology* **96**, 644–650.
2. Baker B. L. and Dermody W. C. (1976) Effect of hypophysectomy on immunocytochemically demonstrated gonadotropin-releasing hormone in the rat brain. *Endocrinology* **98**, 1116–1122.
3. Barry J., Dubois M. P. and Poulain P. (1974) Immunofluorescence study of the preoptico-fundibular LRF neurosecretory pathway in the normal, castrated, or testosterone treated male guinea pig. *Endocrinology* **95**, 1416–1423.



4. Bauer-Dantoin A. C., Hollenberg A. N. and Jameson J. L. (1993) Dynamic regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in the anterior pituitary gland during the rat estrous cycle. *Endocrinology* **133**, 1911–1914.
5. Beauvillain J.-C., Tramu G. and Garaud J.-C. (1984) Coexistence of substances related to enkephalin and somatostatin in granules of the guinea-pig median eminence: demonstration by use of colloidal gold immunocytochemical methods. *Brain Res.* **301**, 389–393.
6. Beauvillain J. C., Moise E., Dutriez I., Mitchell V., Poulain P. and Mazzuca M. (1992) Localization of mu opioid receptors on the membranes of nerve endings and tanyocytes in the guinea-pig median eminence by electron microscopic radioautography. *Neuroscience* **49**, 936–952.
7. Beauvillain J. C. and Tramu G. (1980) Immunocytochemical demonstration of LH-RH, somatostatin and ACTH like peptide in osmium-postfixed, resin-embedded median eminence. *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 1014–1017.
8. Bonfanti L., Olive S., Poulain D. A. and Theodosis D. T. (1992) Mapping of the distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule throughout the central nervous system of the adult rat: an immunohistochemical study. *Neuroscience* **49**, 419–436.
9. Bruder J. M., Spaulding A. J. and Wierman M. E. (1996) Phorbol ester inhibition of rat gonadotropin-releasing hormone promoter activity: role of Fos and Jun in the repression of transcription. *Molec. Endocrinol.* **10**, 35–44.
10. Butcher R. L., Collins W. E. and Fugo N. W. (1974) Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone, and estradiol 17 beta throughout the 4-days estrous cycle of the rat. *Endocrinology* **94**, 1704–1708.
11. Caraty A., Locatelli A. and Martin G. B. (1989) Biphasic response in the secretion of gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with estradiol. *J. Endocrinol.* **123**, 375–382.
12. Ching M. (1982) Correlative surges of LHRH, LH and FSH in pituitary stalk plasma and systemic plasma of rat during proestrus. *Neuroendocrinology* **34**, 279–285.
13. Ciofi P., Vandenbulcke F., Dutoit S., Deneux D., Mansour A., Watson S. J., Tramu G. and Beauvillain J.-C. (1995) Mu opioid receptor-like immunoreactivity in the rat median eminence: distribution and plasticity in expression. *Soc. Neurosci. Abstr.* **21**, 1869.
14. Cooper K. J., Fawcett C. P. and McCann S. M. (1974) Variation in pituitary responsiveness to a luteinizing hormone/ follicle stimulating hormone releasing factor (LH-RF/FSH-RF) preparation during estrous cycle. *Endocrinology* **95**, 1293–1299.
15. Dutriez I., Lagny-Pourmir I., Epelbaum J. and Beauvillain J. C. (1997) Ultrastructural localization of galanin and galanin receptors in the guinea pig median eminence. *Brain Res.* **753**, 36–46.
16. Elmquist J. K., Swanson J. J., Sakaguchi D. S., Ross L. R. and Jacobson C. D. (1994) Developmental distribution of GFAP and vimentin in the Brazilian opossum brain. *J. comp. Neurol.* **344**, 283–296.
17. Fink G. (1994) Molecular principles from neuroendocrine models: steroid control of central neurotransmission. *Prog. Brain Res.* **100**, 139–147.
18. Fink G. (1995) The self priming effect of LHRH: a unique servomechanism and possible cellular model for memory. *Front. Neuroendocrinol.* **16**, 183–190.
19. Fink G. and Jamieson M. G. (1976) Immunoreactive luteinizing hormone releasing factor in rat pituitary stalk blood: effects of electrical stimulation of the medial preoptic area. *J. Endocrinol.* **68**, 71–87.
20. Fink G., Sarkar D. K. and Chiappa S. A. (1977) Gonadotrophin releasing hormone surge during pro-oestrus: rôle of steroid hormones. *J. Endocrinol.* **75**, 46P–47P.
21. Gordon J. H. and Reichlin S. (1974) Changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone releasing factor during the rat estrous cycle. *Endocrinology* **94**, 974–978.
22. Gore A. C. and Roberts J. L. (1995) Regulation of gonadotropin releasing hormone gene expression in the rat during the luteinizing hormone surge. *Endocrinology* **136**, 889–896.
23. Jennes L. and Stumpf W. E. (1986) Gonadotropin-releasing hormone immunoreactive neurons with access to fenestrated capillaries in mouse brain. *Neuroscience* **18**, 403–416.
24. Kalra S. P. (1993) Mandatory neuropeptide-steroid signalling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocr. Rev.* **14**, 507–538.
25. King J. C. and Letourneau R. J. (1994) Luteinizing hormone-releasing hormone terminals in the median eminence of rats undergo dramatic changes after gonadectomy, as revealed by electron microscopic image analysis. *Endocrinology* **134**, 1340–1351.
26. King J. C., Ronsheim P. M. and Rubin B. S. (1996) Plastic changes in LHRH terminals, glia and portal capillaries of the median eminence as a function of ovariectomy. *Soc. Neurosci. Abstr.* **22**, 959.
27. Koslowski G. P. and Coates P. W. (1985) Ependymoneural specialisation between LHRH fibers and cells of the cerebroventricular system. *Cell Tiss. Res.* **242**, 301–311.
28. Lanbug M. C. and Watson R. E. (1992) Estrogen receptor-immunoreactive glia, endothelial, and ependyma in guinea pig preoptic area and median eminence: electron microscopy. *Endocrinology* **130**, 364–372.
29. Lee W.-S., Smith S. and Hoffman G. E. (1990) Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express fos protein during the proestrous surge of luteinizing hormone. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 5163–5167.
30. Levine J. E., Chappell P., Besecke L. M., Bauer-Dantoin A. C., Wolfe A. M., Porkka-Heiskanen T. and Urban J. H. (1995) Amplitude and frequency modulation of pulsatile luteinizing hormone-releasing hormone release. *Cell. molec. Neurobiol.* **1**, 117–139.
31. Levine L. E. and Ramirez V. D. (1982) Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy as estimated with push-pull cannulae. *Endocrinology* **111**, 1439–1448.
32. Ma Y. J., Junier M. P. and Ojeda S. R. (1992) Transforming growth factor- $\alpha$  gene expression in the hypothalamus is developmentally regulated and linked to sexual maturation. *Neuron* **9**, 657–670.
33. Ma Y. J., Von Der Emde K. B., Rage F., Westel W. C. and Ojeda S. R. (1997) Hypothalamic astrocytes respond to transforming growth factor- $\alpha$  with the secretion of neuroactive substances that stimulate the release of luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* **138**, 19–25.
34. Malik K. F., Silverman A.-J. and Morrell J. I. (1991) Gonadotropin-releasing hormone mRNA in the rat: distribution and neuronal content over the estrous cycle and after castration of males. *Anat. Rec.* **231**, 457–466.
35. Mann H. B. and Whitney D. R. (1947) On a test of whether one or two random variables is statistically larger than the other. *Ann. math. Statist.* **18**, 50–60.

36. Marks D. L., Smith M. S., Vrontakis M., Clifton D. K. and Steiner R. A. (1993) Regulation of galanin gene expression in gonadotropin-releasing hormone releasing hormone neurons during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* **132**, 1836–1844.
37. Moenter S. M., Caraty A., Locatelli A. and Karsch F. J. (1991) Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology* **129**, 1175–1182.
38. Olmos G., Naftolin F., Perez J., Tranque P. A. and Garcia-Segura L. M. (1989) Synaptic remodelling in the rat arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neuroscience* **32**, 663–667.
39. Oota Y., Kobayashi H., Nishioka R. S. and Bern H. A. (1974) Relationship between neurosecretory axons and ependymal terminals on capillary walls in the median eminence of several vertebrates. *Neuroendocrinology* **16**, 127–136.
40. Park O.-K., Gugneja S. and Mayo K. E. (1990) Gonadotropin-releasing hormone gene expression during the rat estrous cycle: effects of pentobarbital and ovarian steroids. *Endocrinology* **127**, 365–372.
41. Park O.-K. and Ramirez V. D. (1989) Spontaneous changes in LHRH release during the rat estrous cycle, as measured with repetitive push-pull perfusions of the pituitary gland in the same female rats. *Neuroendocrinology* **50**, 66–72.
42. Parnet P., Lenoir V., Palkovits M. and Kerdelhue B. (1990) Estrous cycle variations in gonadotropin-releasing hormone, substance P and beta-endorphin contents in the median eminence, the arcuate nucleus and the medial preoptic nucleus in the rat: a detailed analysis of proestrus changes. *J. Neuroendocrinol.* **2**, 291–296.
43. Porkka-Heiskanen T., Urban J. H., Turek F. W. and Levine J. E. (1994) Gene expression in a subpopulation of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons prior to the preovulatory gonadotropin surge. *J. Neurosci.* **14**, 5548–5558.
44. Rosie R., Thomson E. and Fink G. (1990) Oestrogen positive feedback stimulates the synthesis of LHRH mRNA in neurones of the rostral diencephalon of the rat. *J. Endocrinol.* **124**, 285–289.
45. Rothfeld J., Hejmancik J. F., Conn P. M. and Pfaff D. W. (1989) *In situ* hybridisation for LHRH mRNA following estrogen treatment. *Molec. Brain Res.* **6**, 121–125.
46. Rubin B. S. and King J. C. (1995) A relative depletion of luteinizing hormone releasing hormone was observed in the median eminence of young but not middle-aged rats on the evening of proestrus. *Neuroendocrinology* **62**, 259–269.
47. Rubin B. S., Mitchell S. and King J. C. (1995) Reconstruction of populations of luteinizing hormone releasing hormone neurons in young and middle-aged rats reveal progressive increases in subgroups expressing Fos protein on proestrus and age-related deficits. *Endocrinology* **136**, 3823–3830.
48. Sarkar D. K., Chiappa S. A. and Fink G. (1976) Gonadotropin releasing hormone surge in pro-oestrus rat. *Nature* **264**, 461–463.
49. Sarkar D. K. and Minami S. (1995) Diurnal variation in luteinizing hormone releasing hormone and  $\beta$ -endorphin release in pituitary portal plasma during the rat estrous cycle. *Biol. Reprod.* **53**, 38–45.
50. Schwartz N. B. (1974) The role of FSH and LH and of their antibodies on follicle growth and on ovulation. *Biol. Reprod.* **10**, 236–272.
51. Sherwood N. M., Chiappa S. A., Sarkar D. K. and Fink G. (1980) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in pituitary stalk blood from proestrus rats: effect of anaesthetics and relationship between stored and released GnRH and luteinizing hormone. *Endocrinology* **107**, 1410–1417.
52. Silverman R. C., Gibson M. J. and Silverman A. J. (1991) Relationship of glia to GnRH axonal outgrowth from thirds ventricular grafts in hgp hosts. *Expl. Neurobiol.* **114**, 259–274.
53. Suzuki M. and Nishihara M. (1995) Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone gene expression during rat estrous cycle. *Endocrinol. J.* **42**, 789–796.
54. Theodosis D. T., Rougon G. and Poulain D. A. (1991) Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated N-CAM in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 5494–5498.
55. Tsou R. C., Dialely R. A., McLanahan C. S., Parent A. D., Tindall G. T. and Neill J. D. (1977) Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) levels in pituitary stalk plasma during the preovulatory gonadotropin surge of rabbits. *Endocrinology* **101**, 534–539.
56. Ugrumov M., Hisano S. and Daikoku S. (1989) Topographic relations between tyrosine hydroxylase and luteinizing hormone releasing hormone-immunoreactive fibers in the median eminence of adult rats. *Neurosci. Lett.* **102**, 159–164.
57. Vandembulcke F., Pollard H., Mitchell V. and Beauvillain J.-C. (1993) Radioimmunocytochemical distribution of neutral endopeptidase (enkephalinase E. C.3.4.24.11) at the ultrastructural level in the rat median eminence. *J. Neuroendocrinol.* **5**, 205–212.
58. Wang H. J., Hoffman G. E. and Smith M. S. (1995) Increased GnRH mRNA in the GnRH neurons expressing cFos during the proestrous LH surge. *Endocrinology* **138**, 3673–3676.
59. Witkin J. W. (1990) Access of luteinizing hormone-releasing hormone neurons to vasculature in the rat. *Neuroscience* **37**, 501–506.
60. Xia L., Van Vugt D., Alston E. J., Luckhaus J. and Ferin M. (1992) A surge of gonadotropin-releasing hormone accompanies the estradiol-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey. *Endocrinology* **131**, 2812–2820.
61. Zoeller R. T. and Young W. S. (1988) Changes in cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding gonadotropin-releasing hormone in the anterior hypothalamus of female rats during the estrous cycle. *Endocrinology* **123**, 1688–1689.

(Accepted 2 October 1997)

**DEFINITIVE EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF PLASTICITY IN THE EXTERNAL ZONE OF THE MEDIAN EMINENCE DURING THE RAT ESTROUS CYCLE: IMPLICATION OF NEURO-GLIO-ENDOTHELIAL INTERACTIONS IN THE GnRH RELEASE**

V. PREVOT,<sup>1</sup> D. CROIX,<sup>1</sup> S. BOURET<sup>1</sup>, S. DUTOIT,<sup>1</sup> G. TRAMU,<sup>2</sup> G. B. STEFANO,<sup>3,4</sup>  
AND J. C. BEAUVILLAIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*INSERM U 422, IFR 22, Neuroendocrinologie et physiopathologie neuronale, place de Verdun, 59045 Lille cedex, France, and*

<sup>2</sup>*CNRS URA 339, Université Bordeaux I, avenue des facultés, 33405 Talence cedex, France, and*

<sup>3</sup>*Mind/Body Medical Institute, Beth Israel Deaconess Medical Center, 1 Deaconess Road, Boston, MA 02215*

<sup>4</sup>*Neuroscience Research Institute, State University of New York at Old Westbury, NY 11568, USA*

*Abbreviated title:* GnRH nerve terminals and plasticity in the median eminence

*Corresponding author:*

Vincent Prevot, INSERM U422, place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

*Telephone number:* +33-3-20-62-20-62; *Fax number:* + 33-3-20-62-20-61;

*e-mail address :* prevot@biserte.lille.inserm.fr

**Abstract-**Despite intense investigation, the demonstration of plasticity in the External zone of the median eminence concerning GnRH release has never been reported. In this study we investigate whether dynamic transformations of the GnRH nerve terminals and/or tanycytes in the external zone of the median eminence of the hypothalamus occurred during the rat estrous cycle, by following individual GnRH-immunoreactive nerve terminals on serial ultrathin sections observed by electron microscopy. Female rats were killed at 1600 h diestrus (n = 3), i.e., when estrogen levels are basal and GnRH release is low, and at 1600 h proestrus (n = 4), i.e., when estrogen levels peak and the preovulatory GnRH surge occurs. Our results show that in median eminence obtained from proestrus rats,  $12.0 \pm 1,6$  % of the GnRH nerve terminals were observed making physical contact with the basal lamina, i.e., the pericapillary space. In median eminence obtained from diestrus rats, no contacts were observed. On proestrus, numerous physical contacts between GnRH nerve terminals and the basal lamina occurred by evagination of the basal lamina and/or by emerging processes from GnRH nerve terminals. The quantification of the percent evagination of the basal lamina revealed that the basal lamina was at least two fold more tortured in appearance during proestrus. Altogether, these results demonstrate for the first time the existence of dynamic plastic changes in the external zone of the median eminence allowing GnRH nerve terminals to contact the portal vessels on the day of proestrus.

**Key words:** *LHRH, tanycytes, median eminence, plasticity, hypothalamus, estrogen.*

## INTRODUCTION

Gonadotropin releasing hormone (GnRH) is synthesized in neuronal cell bodies diffusely distributed in the hypothalamic preoptic area and secreted from neuroendocrine terminals localized in the external zone of the median eminence (ME). Once secreted, GnRH enters the portal vessels and is then transported to the anterior pituitary, where it modulates the synthesis and secretion of gonadotropins. In females, a proestrus surge of GnRH<sup>9,34,46,48,50,55</sup> provides a neural trigger for the preovulatory luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) surges that induce ovulation. The modulation of the GnRH system occurs both at the cell body level, in the preoptic area, and at its release site, in the ME, via neuronal,<sup>20,41,49</sup> glial,<sup>36</sup> endothelial,<sup>1,38,40</sup> and humoral factors.<sup>11,21</sup>

In order to pass on information most neurons form chemical signals for synaptic transmission. In this regard, neuroendocrine neurons, i.e., GnRH neurons, need to contact the pericapillary space, i.e., parenchymatous basal lamina, so that they can secrete the neurohormone into the portal blood. The problem with GnRH nerve terminals, contrary to what is observed with the nerve terminals of the other hypophysiotropic systems,<sup>6,7,16,17,19,27</sup> is that they are extremely rarely observed in contact with the pericapillary space, even on the day of proestrus when GnRH release is at its maximum.<sup>see 39</sup> This has been a major problem leading to a lack of understanding as to the mechanism involved with getting GnRH to the portal vessels.

In the present report we demonstrate for the first time that the actual cells, i.e., neural, glial and endothelial, of the external zone of the ME undergo conformational changes resulting in the physical contact between GnRH nerve endings and parenchymatous basal lamina required for GnRH to enter into the portal circulation during proestrus. We refer to

these dynamic changes as being plastic, i.e., dynamically changing, since they cannot be found in diestrus animals. Taken together, plasticity becomes an important phenomenon in the regulation of GnRH release at the ME level.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Animals.*

Seven female Wistar rats (240-275 g) were maintained on a 14 h light, 10 h dark schedule (lights on at 0500 h), with food and water *ad libitum*. The estrous cycle was monitored by daily inspection of vaginal cytology. After at least two complete 4 days cycles, the animals were killed between 1500 h and 1600 h on diestrus II (n=3) and proestrus (n = 4). All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), regarding mammalian research.

### *Tissue preparation.*

After decapitation hypothalamus were rapidly removed, and fixed by immersion in a mixture of 2% paraformaldehyde, 0.2% picric acid, 0.1% glutaraldehyde, in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 2 h at 4°C. Pieces of tissue were postfixed for 1 h at room temperature with 1% OsO<sub>4</sub> in phosphate buffer, and were embedded in Araldite after dehydration.

### *Serial ultrathin sections.*

Semithin sections (1-2 µm thick) were used to progressively approach and identify the portion of tissue to be studied. Five to twenty-five serial ultrathin sections (90 nm thick) were taken from the same antero-posterior part of the ME that was defined in our previous study,<sup>39</sup> i.e., when the pituitary stalk just became distinct from the base of hypothalamus but still remained attached by tissue, including capillaries of the hypophyseal portal vascular

system (Fig. 1). An antero-posterior field varying from 0,45 to 2,16  $\mu\text{m}$  was also studied in each animal.

#### *Immunocytochemistry staining procedures: Postembedding immunocytochemistry*

Ultrathin sections were treated using the immunogold procedure as previously described (Beauvillain *et al.*, 1984). Briefly, after a preliminary treatment with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10%, 8 min) the grids (50 meshes) were individually floated on a drop of the following reagents and washing solutions, put down on parafilm (American National Can, Greenwich): (1) rabbit anti-GnRH (1/10000) in Tris-buffered saline (TBS 0.1 M; pH 7.4) containing 1% bovine serum albumin, and 1% normal goat serum for 60 h at 4°C; (2) TBS to remove excess antibodies (3  $\times$  10 min); (3) colloidal gold (15 nm)-labelled goat antirabbit immunoglobulins (Amersham, Les Ulis, France) 1/50 in TBS for 90 min at room temperature ; (4) TBS (3  $\times$  10 min) ; (5) distilled water (2  $\times$  10 min). The sections were also counterstained with uranyl acetate and lead citrate before observation. Studies on the specificity of GnRH antisera have been previously described.<sup>3,5</sup>

#### *Morphological analysis.*

The morphological analysis of the serial sections was carried out on electron microscope (Zeiss EM 902, Germany) for each animal. An electron microphotograph montage of 40-50 microphotographs of all the ME external zone was made for the first observed section in each animal. The photographs were taken at an original magnification of 7000 $\times$ ; they were further magnified to 21000 $\times$  by printing. All immunodetected terminals confined to a distance of 5  $\mu\text{m}$  or less from the basal lamina were listed on this montage. This



montage was used to facilitate localization of the labeled terminals on the following serial sections at the time of observation on microscope. The morphological evolution of each terminal was analyzed on the microphotographs taken on the successive sections.

## **Quantitative analysis**

*Quantification of GnRH terminals contacting the basal lamina.* The number of immunoreactive GnRH terminals contacting the basal lamina per animal was divided by the number of GnRH terminals confined to a distance of 5  $\mu\text{m}$  or less from the basal lamina (number of studied GnRH terminals, Table 1) and multiplied by 100 to obtain the percentage of GnRH terminal contacting the basal lamina (Table 1).

*Quantification of the plastic changes in the ME external zone.* For each photomontage, the length of the ME was evaluated by adding up rectilinear portions of 50  $\mu\text{m}$  corresponding to its contour (Fig. 1). Otherwise, a cartographer's wheel was used to measure the real length of the parenchymatous basal lamina; the evaginations that were not continuous with the subjacent basal lamina were not taken into account. For each ME, the degree of evagination of the basal lamina was calculated by subtracting its evaluated length by rectilinear portions, to the real length of the parenchymatous basal lamina, and dividing by the evaluated length by rectilinear portions of the ME. The result was multiplied by 100 to obtain a percentage of evagination for the basal lamina. A Mann-Witney *U*-test was performed on Sigmastat (Jandel Scientific) for statistical analysis. Differences between two groups were considered as significant when the *P* value was less than 0.05.

### *Radioimmunoassays.*

After decapitation, to verify the physiological stage of each animal, trunk blood was collected into vials containing 0.1 ml of 0.3 M EDTA for 5 ml of blood and centrifuged. Plasma was stored at -20°C until subjected to an RIA for luteinizing hormone (LH) and estrogen.

Plasma LH levels were measured using materials supplied by the NIDDK rat pituitary hormone distribution program (Baltimore, MD) and values expressed in terms of the LH pituitary reference preparation RP3. Assay sensitivity was 0.02 ng / tube, and intra-assay and inter-assay variabilities were 6 % and 8.5 % respectively.

Plasma estradiol was measured using a RIA kit optimised for the direct quantitative determination of very low concentrations of  $17\beta$  estradiol in human serum and plasma (e. g. in children), purchased from SORIN Biomedica (Antony, France). Assay sensitivity was 0.2 pg / tube and intraassay and interassay variabilities were 5.6 % and 7.3 % respectively.

## RESULTS

### *Morphological analysis of individual GnRH nerve terminals*

All the GnRH nerve endings confined to a distance of 5  $\mu\text{m}$  from the parenchymatous basal lamina were followed on serial sections over 0.45 to 1.80  $\mu\text{m}$ , e.g. on 5 to 20 serial sections (Table 1). In ME obtained from proestrous rats,  $12.0 \pm 1.6$  % of the studied GnRH nerve endings were observed making a close contact with the parenchymatous basal lamina (Table 1). A rigorous analysis of these tissues in diestrous rats did not reveal similar contacts between these structures (Table 1,  $p < 0.001$ ). In diestrus, some nerve endings were observed on more than 20 serial sections at less than 0,5  $\mu\text{m}$  from the basal lamina, however, they were never in close apposition.

The day of proestrus, some GnRH terminals emitted very thin processes (0,2 to 0,5  $\mu\text{m}$  of thickness) in the direction of the parenchymatous basal lamina (Fig. 2C and Fig. 3) that penetrates between two ependymal processes to reach the parenchymatous basal lamina and thus contacts the pericapillary space (Fig. 3). When the processes were observed on serial sections, their immunostaining was most often light or absent (Fig. 3D). Some contacts between GnRH nerve terminals and the subjacent parenchymatous basal lamina were observed on a large surface of the axoplasmic membrane that could be followed on serial sections (Fig. 4).

Numerous basal lamina fragments emitting evaginations toward the GnRH nerve terminals were observed in tissue of animals that were in proestrus (Fig. 2A-C). Depending on the sectioning plan, these evaginations of the basal lamina can form rings that appear in the tissue (Fig. 2A). Some basal lamina fragments were observed penetrating GnRH nerve terminals (Fig. 5A). In many cases, basal lamina rings were observed entirely embedded in

the GnRH nerve terminals (Fig. 5-6). The contacts between these evaginations of the basal lamina and GnRH nerve terminals were only observed on 3 to 7 serial ultrathin sections. The identification of this structure as basal lamina was possible on two sections at best. In some cases contacts by evaginations of the basal lamina would occur in GnRH nerve terminals distant from the subjacent basal lamina by more than 1  $\mu\text{m}$  (Fig. 5B). An accumulation of secretory granules and synaptic vesicles at the level of the basal lamina also was present, indicating these were active secretory elements. In some cases fusion of neurosecretory granules with the basal lamina also was observed (Fig. 5A-D; Fig. 6C).

#### *Quantitative analysis of the basal lamina length*

The percent evagination of the parenchymatous basal lamina was significantly elevated in proestrous rats compared to those in diestrous ( $p < 0,05$ ; Table 1, Fig. 7). Animals sacrificed in proestrus exhibited a basal lamina that appeared very tortuous in shape whereas this feature was not observed in animals sacrificed in diestrus.

#### *Hormone levels*

Average plasma LH and estrogen levels, as determined by RIA, were typical of the estrous cycle time points that were examined. LH and estrogen levels were low on the afternoon of diestrus,  $0.6 \pm 0.2$  ng / ml and  $6 \pm 3$  pg / ml, respectively, whereas they were elevated on the afternoon of proestrus  $9 \pm 3$  ng / ml and  $27 \pm 7$  pg / ml, respectively.

## DISCUSSION

The present study demonstrates for the first time the existence of cellular conformational changes involving different cell types in the external zone of the ME that directly provide the contact necessary for GnRH secretion into the fenestrated capillaries of the portal blood vessels. This “plastic” phenomenon exhibits actual physical contacts on the day of proestrus between the GnRH nerve terminals and the pericapillary space that might involve both GnRH-axon growth and tuncytic processes withdrawal, as it was hypothesized previously by different authors,<sup>22,25,29,39</sup> but could also imply endothelium outgrowth. The quantified morphological data reveal a statistically significant increase and presence of contacts between GnRH neuroendocrine terminals and the parenchymatous basal lamina in proestrus and an absence of these contacts in diestrus. These results support our previous observations for the existence of contacts between GnRH nerve terminals and the pericapillary space the day of proestrus.<sup>39</sup> However, in this latter study the contacts were unquantifiable due to their rarity when the external zone of the ME was studied on single ultrathin sections. Based on the present detailed serial section examination, we note the presence of thin GnRH nerve processes extending toward the pericapillary space and also predict that many of the small unlabelled nerve endings in close contact with the basal lamina are in fact GnRH nerve endings. Taken together, the results strongly suggest that the contacts between these elements are dynamic in nature, that is only appearing at the right moment, proestrus.

Furthermore, since the above contacts are not observed in diestrus, this datum suggests that these physical contacts could not be required at this stage. However, taking into

account the previous work using intraperitoneal injection of retrograde tracer<sup>18,51</sup> or evaluating GnRH levels in the portal blood on diestrus,<sup>47</sup> the reality of contacts between GnRH nerve endings and the pericapillary space cannot be ruled out. Our results support the fact that they are statistically impossible to detect by a morphological approach and demonstrate why if they are present at all they are rare, simply stated, they are plastic in nature existing only for short periods of time.

In proestrus, the presence of numerous evaginations of the parenchymatous basal lamina directed toward the GnRH nerve terminals and the processes emerging from the latter directed toward the basal lamina suggests the existence of a reciprocal attraction mechanism between these structures (Fig. 8). The quantification of the degree of evagination of the basal lamina demonstrates that the basement membrane contains at least two folds that are more tortured in appearance during proestrus, demonstrating the existence of cellular morphological changes in the external zone of the ME at this stage of the cycle. We surmise that the plastic changes might increase the working area of the pericapillary space, increasing the probability for the GnRH nerve terminals for contacting the parenchymatous basal lamina. It should also be noted that these results, at first glance, appear to be in conflict with an observation made through the use of confocal microscopy.<sup>23</sup> In this report, the authors concluded that the capillary loops were not dependent on ovarian steroids. This discrepancy, in all probability, may be due to the fact that the basal lamina evaginations observed in the present study were found at the ultrastructural level. This anatomical detail cannot be detected at the resolution level of confocal microscopy.

We further surmise that the numerous evaginations of the basal lamina and emerging processes of GnRH nerve terminals observed on serial sections might represent the beginning

or the end of a plastic phenomenon leading to the rapid establishment of large contacts between the basement membrane and the GnRH terminal, as illustrated on Fig. 8. Indeed the day of proestrus, when serial sections of the ME are observed, the number of GnRH neuro-vascular contacts observed rise dramatically, while the number of GnRH neuro-vascular contacts observed to be establish on a large surface of the axoplasmic membrane remains unchanged. Thus, the fact that the day of proestrus contacts between the basal lamina and the GnRH nerve terminals are observed in most cases from evaginations of the basal lamina or from nerve endings emerging processes might lead to the concept of the existence of a rapid vascular-neuro-glial plasticity and the resulting communication (Fig. 8). These rapid changes would appear very different from the synaptic remodeling observed in the rat arcuate nucleus during the estrous cycle, which takes place in 48 h for a complete cycle of denervation and reinnervation of neurons.<sup>37</sup> We surmise that the plasticity observed in the external zone of the median eminence could be induced directly by steroids, since between diestrus and proestrus there is a dramatic increase in estrogen plasma levels. The eventual implication of estrogen in the induction of plastic phenomenon in the external zone of the median eminence is strengthened by the fact that estrogen receptors are expressed both in tanycytes<sup>26</sup> and in ME endothelial cells.<sup>26,38</sup>

In this regard, estrogen has been shown to modulate neuro-glial apposition on GnRH cell bodies in *Rhesus monkey*.<sup>52,53</sup> In the rat, such morphological changes occurring at the GnRH cell body level were not observed<sup>44</sup> but was found in the arcuate nucleus <sup>see for review 13</sup>, a structure strongly implicated in the regulation of GnRH neuron activity.<sup>8,13</sup> In the arcuate nucleus, the estrogen-stimulated plasticity contributes to the estrogen-stimulated increase in neuronal firing<sup>13</sup> that also is correlated with the release of LH during the ovarian cycle.<sup>56</sup>

Estrogen may also modulate the expression of substances that might act on tanycytes via a paracrine mechanism, such as transforming growth factor  $\alpha$  (TGF  $\alpha$ ), that has been shown to be expressed in tanycytes,<sup>22</sup> TGF $\beta_1$ <sup>32,33</sup> and IGF-I.<sup>14,15</sup> All these factors have been shown to stimulate GnRH release.<sup>14,15,28,32,33</sup> TGF $\beta$  seems moreover to be implicated in rapid glial plasticity<sup>12</sup> and in angiogenesis.<sup>45</sup>

Another attractive candidate that could induce plastic changes in the external zone of the ME throughout the estrous cycle is nitric oxide (NO), a signaling molecule recently demonstrated to stimulate rapid cellular conformational changes, i.e., within 10 min, in cultured neurohypophysial astrocytes,<sup>42</sup> microglia<sup>10</sup> and immune as well as endothelial cells.<sup>30</sup> Furthermore, NO is involved in the regulation of GnRH release from the ME neuroendocrine terminals.<sup>35,40,43</sup> Importantly, endothelial-ME signaling can occur by NO coupling as recently demonstrated.<sup>1,38,40</sup> In this context, it is tempting to speculate that NO may induce cytoskeletal reorganization in the ME external zone leading to tanycytic end feet removal, allowing GnRH terminals to contact the pericapillary space on the day of proestrus.

Regarding the significance of the temporary contacts between the GnRH nerve terminals and the pericapillary space, we surmise that since there are only approximately 1600 GnRH neurons in rat<sup>4,24,54</sup> and 2400 in primates<sup>2,31</sup> that are responsible for species survival via reproduction, this phenomenon represents an enhancement of the function of the GnRH system by insuring direct contact and the passage of the signal into the vascular conduits at the most appropriate physiological time. Counter-intuitively, the lack of contacts in diestrus may also be the critical event, in that it insures that organism's do not remain fixed in the reproductive mode, allowing for critical vegetative functions to occur. Thus, removal of the tanycytes processes from the pericapillary basal lamina is also of critical



significance to the entire process. Together, these data suggest that when reproductive function becomes significant to the organism, the internal structures are present to support its expression. However, when reproduction is not an issue, i.e., during pregnancy or between cycles, this system is “dismantled” so as not to interfere with the performance of other organismic activities. Thus, plastic dismantling or rebuilding represents an efficient process since new cells are not required, just the alteration of the existing cell conformation.

## CONCLUSION

The present work provides definitive evidence for the existence of dynamic plastic changes in the external zone of the ME allowing GnRH nerve terminals to contact the portal vessels on the day of proestrus. On proestrus, contacts by evagination of the basal lamina or by emerging processes from GnRH nerve terminals are frequently observed. Taken together, these morphological cellular changes support the existence of a stimulated rapid vascular-neuro-glial plasticity by estrogen. Different factors like TGFs or NO, that are known to act on GnRH release, may also be involved in this estrogen- dependent plasticity.

*Acknowledgements*-The authors would like to thank Mrs. G. Mortreux for her excellent technical assistance in radioimmunoassays realization and NIDDK for the rat LH RIA material. This work was supported by the University of Lille II, and the FEDER (LARC network).

## REFERENCES

1. Aguan K., Malesh V. B., Ping L., Bhat G. and Brann D. W. (1996) Evidence for physiological role for nitric oxide in the regulation of the LH surge : effect of central administration of antisense oligonucleotides to nitric oxide synthase. *Neuroendocrinology* **64**, 449-455.
2. Barry J. (1979) Immunohistochemistry of luteinizing hormone-releasing hormone-producing neurons of the vertebrates. *Int. Rev. Cytol.* **60**, 179-219.
3. Barry J., Dubois M. P. and Poulain P. (1974) Immunofluorescence study of the preopticoinfundibular LRF neurosecretory pathway in the normal, castrated, or testosterone treated male guinea pig. *Endocrinology* **95**, 1416-1423.
4. Barry J., Hoffman G. E. and Wray S. (1985) LHRH-containing systems. In: A Böjrkund and T Hökfelt (eds): Handbook of chemical neuroanatomy. Vol 4. GABA and Neuropeptides in the CNS, Part I. Amsterdam: Elsevier Science, pp 166-215.
5. Beauvillain J.-C. and Tramu G. (1980) Immunocytochemical demonstration of LH-RH, somatostatin and ACTH like peptide in osmium-postfixed, resin-embedded median eminence. *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 1014-1017 .
6. Beauvillain J.-C., Tramu G. and Garaud J.-C. (1984) Coexistence of substances related to enkephalin and somatostatin in granules of the guinea-pig median eminence: demonstration by use of colloidal gold immunocytochemical methods. *Brain Res.* **301**, 389-393.
7. Bouchaud C. and Bosler O. (1986) The circumventricular organs of the mammalian brain with special reference to monoaminergic innervation. *Int. Rev. Cytol.* **105**, 283-327.

8. Bouret S., Prevot V., Howard A. D., Habert-Ortoli E., Jegou S., Vaudry H., Vermersch P., Beauvillain J.-C. and Mitchell V. (1998) Differential coexpression of galanin receptor (GalR1, GalR2) and proopiomelanocortin (POMC) mRNAs in the rat arcuate nucleus. *Soc Neurosc. Abstr.* **24**, 1609.
9. Ching M. (1982) Correlative surges of LHRH, LH and FSH in pituitary stalk plasma and systemic plasma of rat during proestrus. Effect of anesthetics. *Neuroendocrinology* **34**, 279-285.
10. Dobrenis K., Makman M. H. and Stefano G. B. (1995) Occurrence of the opiate alkaloid-selective  $\mu_3$  receptor in mammalian microglia, astrocytes and kupffer cells. *Brain Res.* **686**, 239-248.
11. Fink G. (1994) Molecular principles from neuroendocrine models: steroid control of central neurotransmission. *Prog. Brain Res.* **100**, 139-147.
12. Gagelin C., Pierre M., Gavaret J. M. and Toru-Delbauffe D. (1995) Rapid TGF beta 1 effects on actin cytoskeleton of astrocytes: comparison with other factors and implications for cell motility. *Glia* **13**, 283-293.
13. Garcia-Segura L. M., Chowen J. A., Parducz A. and Naftolin F. (1994) Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms. *Prog. Neurobiol.* **44**, 279-307.
14. Hiney J. K., Ojeda S. R. and Dees W.L. (1991) Insulin-like growth factor I: a possible metabolic signal involved in the regulation of female puberty. *Neuroendocrinology* **54**, 420-423.

15. Hiney J. K., Srivastava V., Nyberg C. L., Ojeda S. R. and Dees W. L. (1996) Insulin-like growth factor I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. *Endocrinology* **137**, 717-3728.
16. Hisano S., Ishizuka H., Nishiyama T., Tsuruo Y., Katoh S. and Daikoku S. (1986) Immunoelectron microscopic observations of hypothalamic TRH-containing neurons in rats. *Exp. Brain Res.* **63**, 495-504.
17. Ibata Y., Okamura H., Makino S., Kawakami F., Morimoto N. and Chihara K. (1986) Light and electron microscopic immunocytochemistry of GRF-like immunoreactive neurons and terminals in the rat hypothalamic arcuate nucleus and median eminence. *Brain Res.* **370**, 136-143.
18. Jennes L. and Stumpf W. E. (1986) Gonadotropin-releasing hormone immunoreactive neurons with access to fenestrated capillaries in mouse brain. *Neuroscience* **18**, 403-416.
19. Jew J. Y., Leranth C., Arimura A. and Palkovits M. (1984) Preoptic LH-RH and somatostatin in the rat median eminence. An experimental light and electron microscopic immunocytochemical study. *Neuroendocrinology* **38**, 169-175.
20. Kalra S. P. (1986) Neural circuitry involved in the control of LHRH secretion : a model for preovulatory LH release. *Frontiers in neuroendocrinology*, Vol 9 (Martini L, Ganong WF, eds), New York : Raven, 31-75.
21. Kalra S. P. (1993) Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocr. Rev.* **14**, 507-538.
22. King J. C. and Letourneau R. J. (1994) Luteinizing hormone-releasing hormone terminals in the median eminence of rats undergo dramatic changes after gonadectomy, as revealed by electron microscopic image analysis. *Endocrinology* **134**, 1340-1351.

23. King J. C., Ronsheim P. M. and Rubin B. S. (1996) Plastic changes in LHRH terminals, glia and portal capillaries of the median eminence as a function of ovariectomy. *Soc. Neurosci. Abst.* **22**, 959.
24. King J. C., Tobet S. A., Snavely F. L. and Arimura A. A. (1982) LHRH immunopositive cells and their projections to the median eminence and organum vasculosum of the lamina terminalis. *J. Comp. Neurol.* **209**, 287-300.
25. Koslowski G. P. and Coates P. W. (1985) Ependymoneural specialisation between LHRH fibers and cells of the cerebroventricular system. *Cell Tissue Res.* **242**, 301-311.
26. Lanbug M. C. and Watson R. E. (1992) Estrogen receptor-immunoreactive glia, endothelial, and ependyma in guinea pig preoptic area and median eminence : electron microscopy. *Endocrinology* **130**, 364-372.
27. Liposits Z., Gorcs T., Setalo G., Lengvari I., Flerko B., Vigh S. and Schally A. V. (1983) Ultrastructural characteristics of immunolabelled, corticotropin releasing factor (CRF)-synthesizing neurons in the rat brain. *Cell Tissue Res.* **229**, 191-196.
28. Ma Y. J., Berg-von der Emde K., Rage F., Wetsel W. C. and Ojeda S. R. (1997) Hypothalamic astrocytes respond to transforming growth factor-alpha with the secretion of neuroactive substances that stimulate the release of luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* **138**, 19-25.
29. Ma Y. J., Junier M. P. and Ojeda S. R. (1992) Transforming growth factor- $\alpha$  gene expression in the hypothalamus is developmentally regulated and linked to sexual maturation. *Neuron* **9**, 657-670.

30. Magazine H. I., Liu Y., Bilfinger T. V., Fricchione G. L. and Stefano G. B. (1996) Morphine-induced conformational changes in immunocytes, endothelial cells and microglia are mediated by nitric oxide. *J. Immunol.* **156**, 4845-4850.
31. Marshall P. E. and Goldsmith P. C. (1980) Neuroregulatory and neuroendocrine GnRH pathways in the hypothalamus and forebrain of the baboon. *Brain Res.* **193**, 353-372.
32. Melcangi R. C., Galbiati M., Messi E., Magnaghi V., Cavarretta I., Riva M. A. and Zanisi M. (1997) Astrocyte-neuron interactions in vitro: role of growth factors and steroids on LHRH dynamics. *Brain Res. Bull.* **44**, 465-46.
33. Melcangi R. C., Galbiati M., Messi E., Piva F., Martini L. and Motta M. (1995) Type 1 astrocytes influence luteinizing hormone-releasing hormone release from the hypothalamic cell line GT1-1: is transforming growth factor-beta the principle involved? *Endocrinology* **136**, 679-686.
34. Moenter S. M., Caraty A., Locatelli A. and Karsch F. J. (1991) Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology* **129**, 1175-1182.
35. Moretto M., Lopez F. J. and Negro-Villar A. (1993) Nitric oxide regulates luteinizing hormone releasing hormone secretion. *Endocrinology* **133**, 2399-2402.
36. Ojeda S. R. (1994) The neurobiology of mammalian puberty : has the contribution of glial cells been underestimated ? *J. NIH Res.* **6**, 51-56.
37. Olmos G., Naftolin F., Perez J., Tranque P. A. and Garcia-Segura L. M. (1989) Synaptic remodelling in the rat arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neuroscience* **32**, 663-667.

38. Prevot V., Croix D., Rialas C. M., Poulain P., Fricchione G. L., Stefano G. B. and Beauvillain J.-C. (1999) Estradiol Coupling to Endothelial Nitric Oxide Stimulates GnRH Release from Rat Median Eminence via a Membrane Receptor. *Endocrinology* **140**, 652-659.
39. Prevot V., Dutoit S., Croix T., Tramu G. and Beauvillain J.-C. (1998) Semi-quantitative ultrastructural analysis of the localization and neuropeptide content of gonadotropin releasing hormone nerve terminals in the median eminence throughout the estrous cycle of the rat. *Neuroscience* **84**,177-191.
40. Prevot V., Rialas C. M., Croix D., Salzet M., Dupouy J.-P., Poulain P., Beauvillain J.-C. and Stefano G. B. (1998) Morphine and anandamide coupling to nitric oxide stimulates GnRH and CRF release from rat median eminence: neurovascular regulation. *Brain Res.* **790**, 236-244.
41. Ramirez V. D., Feder H. H. and Sawyer C. H. (1984) The role of brain catecholamines in the regulation of LH secretion : a critical inquiry. *Frontiers in neuroendocrinology*, Vol 8 (Martini L, Ganong WF, eds), New York : Raven, 27-84.
42. Ramsell K. D. and Cobbett P. (1996) Nitric oxide induces morphological changes in cultured neurohypophysial astrocytes. *J. Neuroendocrinol.* **8**, 235-240.
43. Rettori V., Belova N., Dees W. L., Nyberg C. L., Gimeno M. and McCann S. M. (1993) Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10130-10134.
44. Romero M. T., Silverman A. J., Wise P. M., Witkin J. W. (1994) Ultrastructural changes in gonadotropin-releasing hormone neurons as a function of age and ovariectomy in rats. *Neuroscience* **58**, 217-225.

45. Sankar S., Mahooti-Brooks N., Bensen L., McCarthy T. L., Centrella M., Madri J. A. (1996) Modulation of transforming growth factor beta receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **97**, 1436-1446.
46. Sarkar D. K., Chiappa S. A., Fink G. and Sherwood N. M. (1976) Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. *Nature* **264**, 461-463.
47. Sarkar D. K. and Minami S. (1995) Diurnal variation in luteinizing hormone-releasing hormone and beta-endorphin release in pituitary portal plasma during the rat estrous cycle. *Biol. Reprod.* **53**, 38-45.
48. Sherwood N. M., Chiappa S. A., Sarkar D. K. and Fink G. (1980) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in pituitary stalk blood from proestrous rats: effects of anesthetics and relationship between stored and released GnRH and luteinizing hormone. *Endocrinology* **107**, 1410-1417.
49. Terasawa E. (1995) Mechanisms controlling the onset of puberty in primates : the role of GABAergic neurons. *The neurobiology of puberty* (Plant TM, Lee PA, eds), Bristol, U.K. : Journal of Endocrinology, 139-151.
50. Tsou R. C., Dailey R. A., McLanahan C. S., Parent A. D., Tindall G. T. and Neill J. D. (1977) Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) levels in pituitary stalk plasma during the preovulatory gonadotropin surge of rabbits. *Endocrinology* **101**, 534-539.
51. Witkin J. W. (1990) Access of luteinizing hormone-releasing hormone neurons to the vasculature in the rat. *Neuroscience* **37**, 501-506.
52. Witkin J. W., Ferin M., Popilskis S. J. and Silverman A. J. (1991) Effects of gonadal steroids on the ultrastructure of GnRH neurons in the rhesus monkey: synaptic input and glial apposition. *Endocrinology* **129**, 1083-1092.

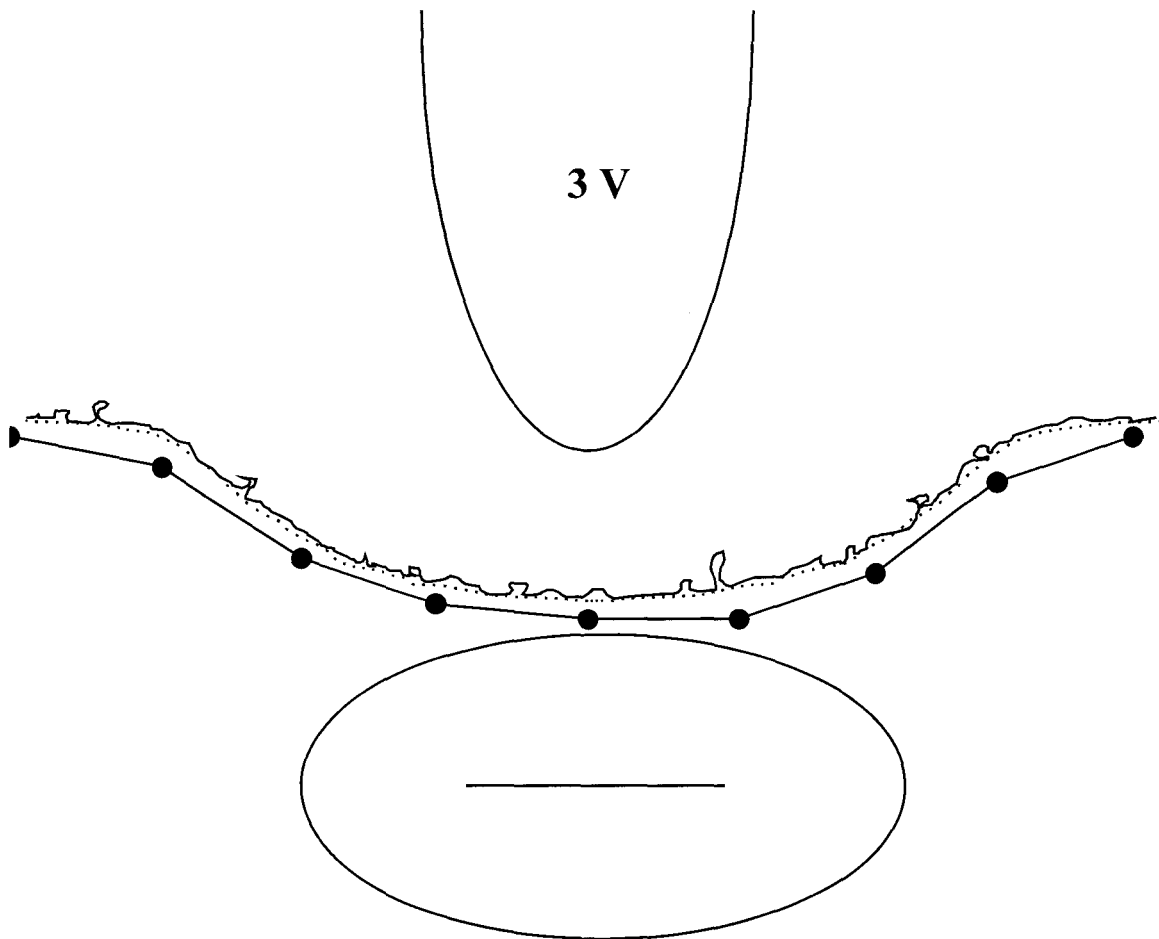


53. Witkin J. W., O'Sullivan H. and Ferin M. (1995) Glial ensheathment of GnRH neurons in pubertal female rhesus macaques. *J. Neuroendocrinol.* **7**, 665-671.
54. Witkin J. W., Paden C. M. and Silverman A. J. (1982) The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinology* **35**, 429-438.
55. Xia L., Van Vugt D., Alston E. J., Luckhaus J. and Ferin M. (1992) A surge of gonadotropin-releasing hormone accompanies the estradiol-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey. *Endocrinology* **131**, 2812-2820.
56. Yeoman R. R. and Jenkins A. J. (1989) Arcuate area of the female rat maintained in vitro exhibits increased afternoon electrical activity. *Neuroendocrinology* **49**, 144-149.

**Table 1.** Quantification of the proportion of GnRH nerve terminals contacting the parenchymatous basal lamina and of the percent evagination of the basal lamina in animals sacrificed on diestrus or on proestrus. The number of serial ultrathin section observed and the number of GnRH nerve terminals studied is reported for each animal.

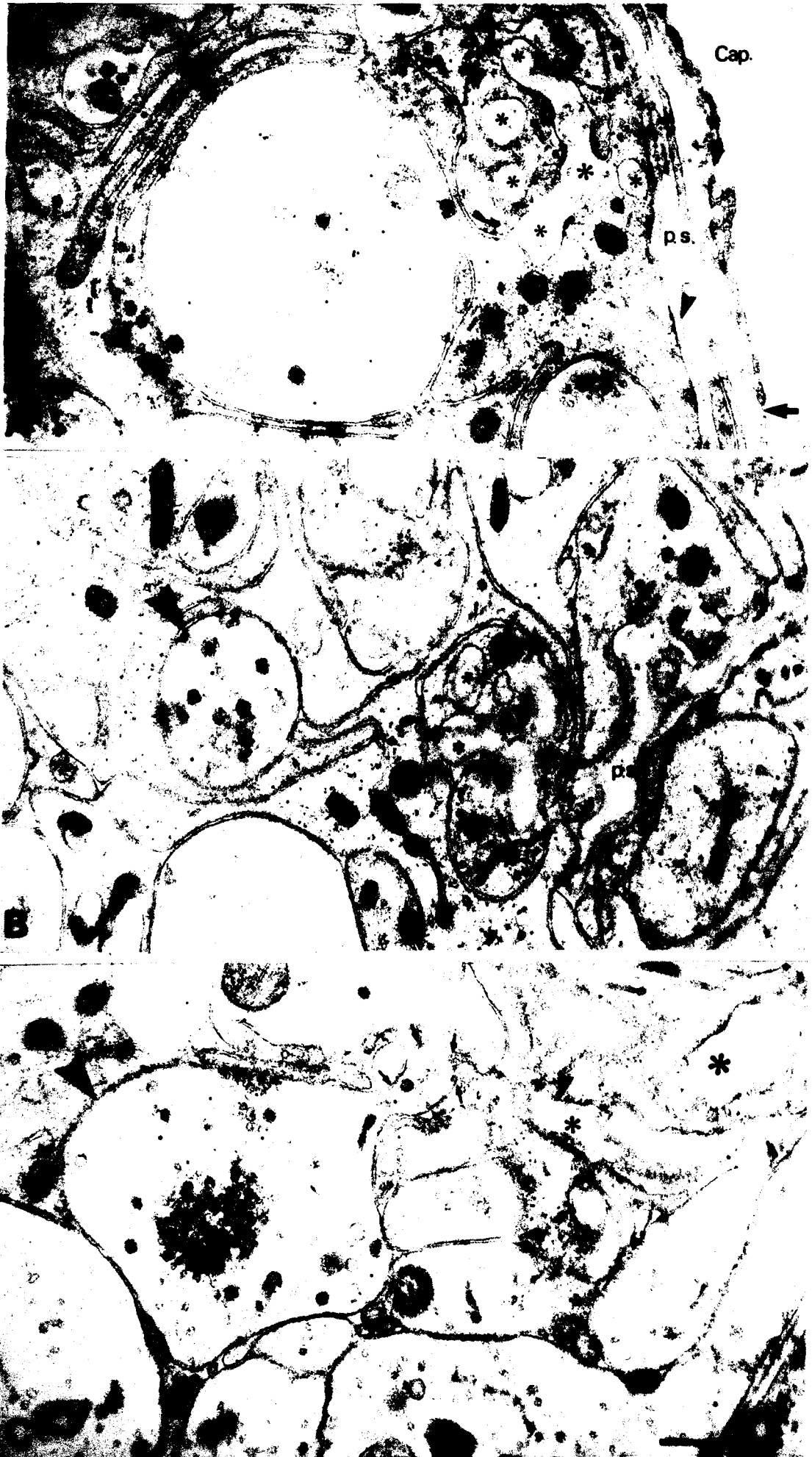
Animal	<i>Estrous Cycle Stage</i>	Number of studied ultrathin sections	Number of studied GnRH nerve terminals	% of GnRH terminal contacting the basal lamina	% of evagination for the basal lamina
409	Diestrus	20	20	0	17,3
393	Diestrus	24	12	0	14,4
398	Diestrus	20	23	0	14,1
<b>Mean ± SEM</b>				<b>0</b>	<b>15.2 ± 1,0</b>
367	Proestrus	15	26	11,5	43,5
629	Proestrus	9	39	7,8	47,9
717	Proestrus	5	35	15,0	32,6
362	Proestrus	13	36	13,8	45,0
Mean ± SEM				<b>12.0 ± 1.6**</b>	<b>42,3 ± 3,9**</b>

\*\* significant difference ( $p < 0,001$ ) between Diestrus and Proestrus



**Fig.1.** Drawing of coronal section explaining the method of quantification for the percentage of evagination for the basal lamina in the median eminence studied region. An electron microphotograph montage of 40-50 microphotographs of the external zone was made in each animal. The photographs were taken at an original magnification of 7000 $\times$ ; they were further magnified by 3. The median eminence contour length (.....) was estimated by adding up rectilinear portions of 50  $\mu\text{m}$  (●—●). The real length of the parenchymatous basal lamina ( $\varphi$ ) was measured using a cartographer's wheel. The percentage of evagination for the basal lamina was calculated as noticed in the materials and methods.

**Fig.2.** Electron micrographs of the median eminence external zone observed in proestrus. Evaginations of the basal lamina (asterisks) toward the GnRH nerve terminals (Big arrowhead) were observed. Depending on the sectioning plan, evaginations of the basal lamina can form rings in the tissue that are often observed in close proximity to GnRH immunolabelled nerve terminals (big arrowhead) (A, B). In A and B the small arrows show a structure evoking the growth of the evagination. Conversely, some GnRH nerve terminals emitted thin processes toward basal lamina fragments (C, fragment indicated by little arrows). Arrow: fenestrated endothelium; little arrowhead: endothelial basal lamina; medium sized arrowhead: parenchymatous basal lamina. Cap.: capillary; p.s.: pericapillary space. Scale bar: 1 $\mu$ m.



**Fig. 3.** Illustration of the interest to observe GnRH nerve terminals on serial sections. The GnRH nerve ending (big arrowhead) observed on A was observed on 15 serial sections allowing to follow its evolution in the median eminence external zone. Here are presented four aspects of this evolution (A-D). On picture B it can be observed a constriction (arrows) leading to the formation of several processes visible in C (middle-sized arrowhead). Note that a process is totally embedded in tancyte. On the picture D, the main fragment of the GnRH nerve ending (big arrowhead) appears to terminate in tissue: indeed this fragment was not observed on the next serial sections. However the thin process of the GnRH nerve ending that was close to the basal lamina on picture C (medium-sized arrowhead), was still observed on picture D (medium-sized arrowhead) even if it was poorly labeled. This GnRH nerve ending fragment was observed in physical contact with the parenchymatous basal lamina on the following sections. Tan.: tancytes. Scale bar: 1 $\mu$ m.

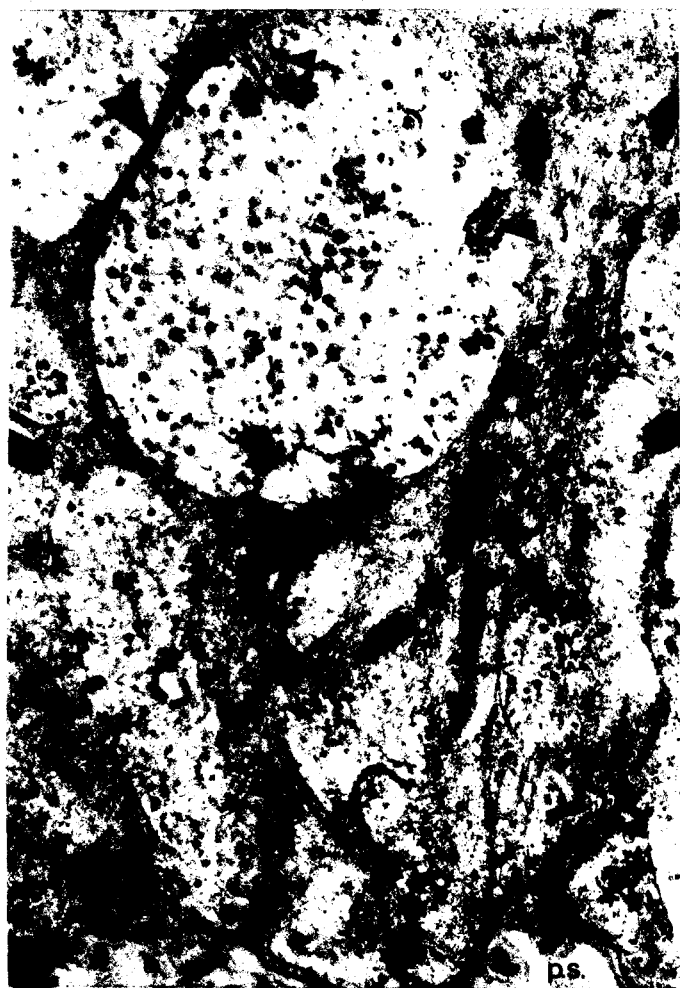


**Fig. 4.** Example of physical contacts established between GnRH nerve terminals and the parenchymatous basal lamina. On this picture the contacts (arrow) occurred on a large surface, since they can be observed on adjacent sections: on A and B is observed the same GnRH nerve ending (big arrowhead), the two sections are separated by 2 ultrathin sections; on C and D is observed the same GnRH nerve ending (big arrowhead), the two sections are separated by 4 ultrathin sections. p.s.: pericapillary space. Scale bar: 1 $\mu$ m.





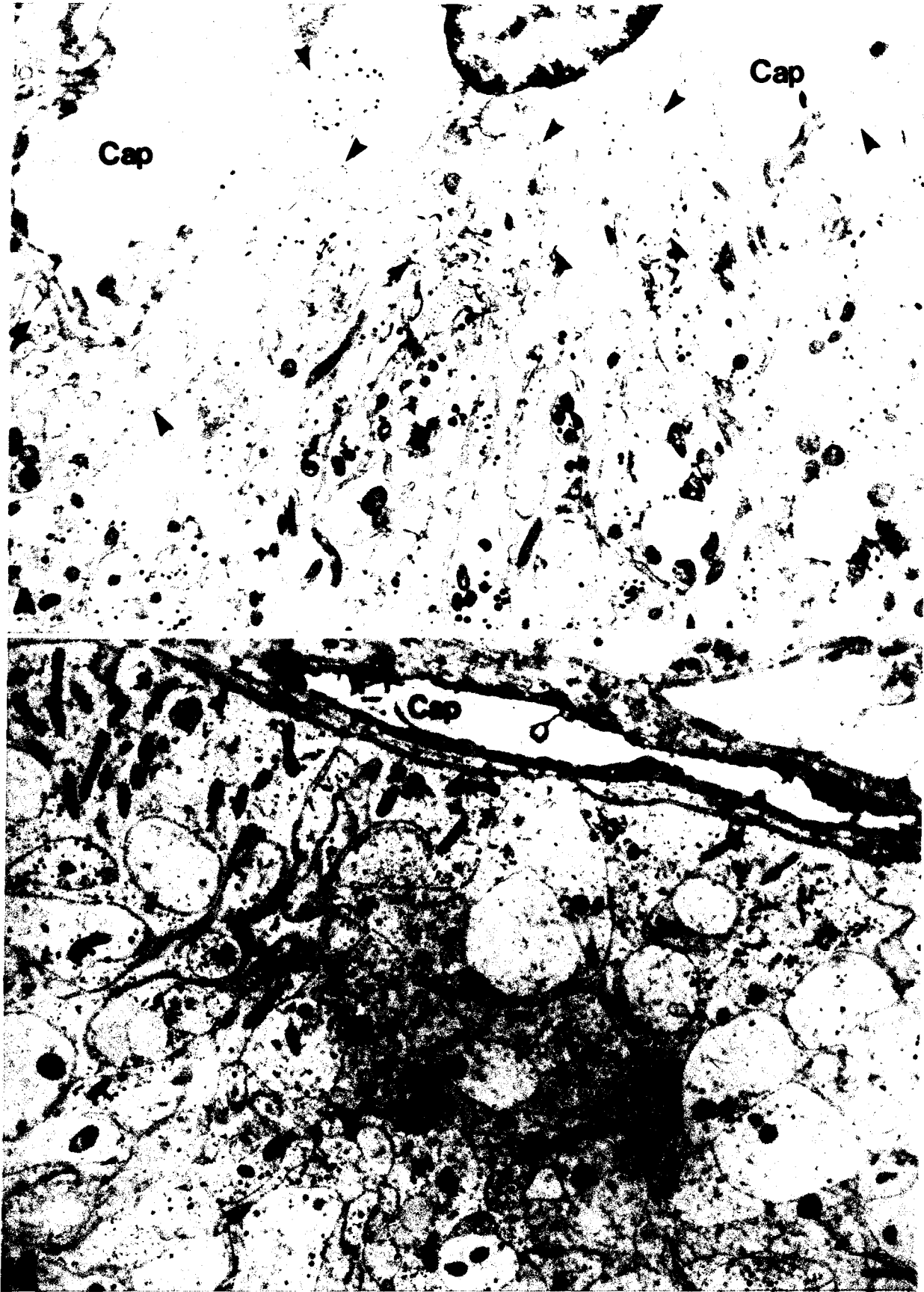
**Fig. 5.** Illustration of different aspects of basal lamina evaginations allowing physical contacts between GnRH nerve terminals and the pericapillary space. In A, an evagination of the basal lamina (little arrowhead) can be observed emerging from the pericapillary space (bottom asterisk). The penetration of the pericapillary space (p.s.) in tissue is easy followed (asterisks) and we can note that it reaches the GnRH nerve terminal (big arrowhead). In this case the physical contact between GnRH nerve terminal and basal lamina occurs at more than 1  $\mu\text{m}$  from the subjacent basal lamina, and thus occurs for a GnRH nerve terminal that seemed localized far from the pericapillary space. In B, C, and D, taking into account our previous observation (A), the element pointed by a medium-sized arrowhead entirely embedded in GnRH nerve terminals (big arrowhead) might correspond to an evagination of the subjacent parenchymatous basal lamina. In B, the presence of the pericapillary space in the GnRH nerve terminal (big arrowhead) is noticed by an asterisk. Note the numerous synaptic vesicles in apposition with the parenchymatous basal lamina (arrowhead) in this nerve terminal, and the fusion of secretory granules (little arrows). In C, notice the evagination of the basal lamina at the bottom of the picture (arrowhead) and the section of two others evaginations embedded in the GnRH nerve terminal (big arrowhead). In D, we observe near the GnRH nerve ending several rings of basal lamina (arrowhead). p.s.: pericapillary space; Cap.: capillary. Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ .

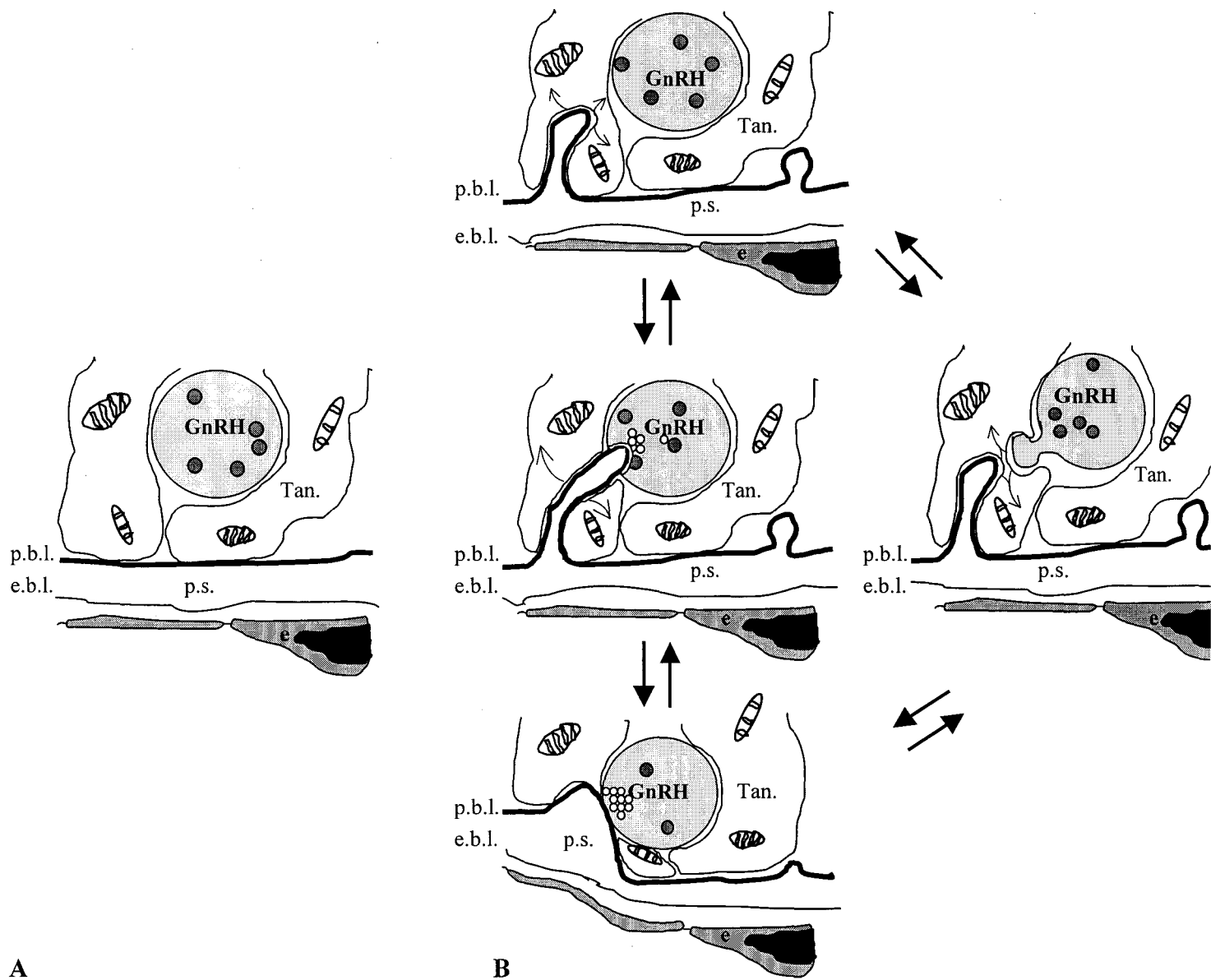


**Fig. 6.** Different examples of sectioned evaginations of the pericapillary space embedded in GnRH nerve endings observed the day of proestrus. The pictures A-C illustrate these types of contact are very frequent at this estrous cycle stage. Little arrowhead: parenchymatous basal lamina; big arrowhead: GnRH nerve terminal; asterisk and p.s.: pericapillary space; Cap.: capillary. Scale bar: 1 $\mu$ m.



**Fig. 7.** Representative electron micrographs showing the aspect of the parenchymatous basal lamina (little arrowhead) in the external zone of the ME in female rats that were either in proestrus (A) or in diestrus (B). The parenchymatous basal lamina was two-times more tortured in shape in animals sacrificed on proestrus (A) than in animals sacrificed on diestrus (B). Cap.: capillary. Scale bar: 1 $\mu$ m.





**Fig. 8.** Summary diagram illustrating the relationship between the parenchymatous basal lamina (p.b.l.), tanycytes (tan.) and GnRH neuroendocrine terminals (GnRH) on diestrous **A** or on proestrous **B**. p.s.: pericapillary space ; e.b.l.: endothelial basal lamina ; thin arrows: tanycytic and/or nerve terminals and/or endothelium plastic changes allowing GnRH terminals to contact the parenchymatous basal lamina ; black arrows: dynamic changes that might occur between each morphological state observed on proestrous. These plastic changes might be under the influence of various factors either secreted by tanycytes and/or endothelium (e) and/or GnRH nerve terminals, or conveyed by the portal blood.



**Article 1.** Les résultats de notre première étude démontrent qu'il existe des contacts entre les terminaisons à GnRH et la lame basale parenchymateuse chez la femelle, mais que ceux-ci sont très rares et exclusivement observés le jour du proœstrus.

Notre travail de quantification montre qu'il existe une variation du nombre de terminaisons immunoreactives pour la GnRH dans la zone externe de l'éminence médiane au cours du cycle œstral. Le nombre de terminaisons observées est maximal à 18h le jour du proœstrus, au moment de la survenue du pic préovulatoire de LH. Cette variation du nombre de terminaisons à GnRH semble être dûe à des variations de charge des terminaisons en neuropeptide plutôt qu'à des phénomènes de plasticité. En effet, la charge des terminaisons en GnRH varie au cours du cycle œstral, et une corrélation positive existe entre le nombre de terminaisons à GnRH observées et la charge en GnRH des terminaisons. Ainsi, au cours du cycle œstral les terminaisons à GnRH de la zone externe de l'éminence médiane pourraient passer alternativement au dessus et au dessous du seuil d'immunodélectabilité. Nous noterons qu'il existe deux pics de mise en charge en décapeptide des terminaisons à GnRH le jour du proœstrus, l'un à 9h et l'autre à 18h. Le fait que le pic de concentration de 9h soit suivi d'une chute significative du contenu en GnRH des terminaisons à 10h, suggère qu'entre 9h et 10h le jour du proœstrus, il existe une libération de GnRH dans le sang porte hypophysaire.

**Article 2.** Les observations de la zone externe de l'éminence médiane ont parfois été réalisées sur plus de 20 coupes ultrafines sériées, ce qui a permis de suivre l'évolution de certaines terminaisons à GnRH sur environ 1,8  $\mu\text{m}$ . Toutes les terminaisons à GnRH localisées à moins de 5  $\mu\text{m}$  de la lame basale parenchymateuse ont été analysées. Les résultats de ces observations montrent que le jour du proœstrus, 12,6 % des terminaisons marquées à l'or colloïdal sont au contact de la membrane basale parenchymateuse. Par contre, le jour du diœstrus, aucune terminaison n'a pu être observée au contact de l'espace péricapillaire.

Les contacts observés le jour du proœstrus s'effectuent majoritairement par l'intermédiaire d'évaginations de la lame basale parenchymateuse qui semble pénétrer à l'intérieur du parenchyme nerveux. Parfois la membrane basale pénètre profondément dans le

tissu. De plus, des éléments rappelant des coupes perpendiculaires d'évaginations, sont souvent visibles dans les terminaisons à GnRH.

La quantification du pourcentage d'évagination de la lame basale montre que cette lame basale parenchymateuse présente deux fois plus d'évaginations le jour du proœstrus que le jour du diœstrus. Ces résultats suggèrent que la surface de contact entre l'éminence médiane et l'espace péricapillaire augmente le jour du proœstrus. Ce phénomène pourrait ainsi augmenter la probabilité, pour les terminaisons à GnRH, de réaliser des contacts neuro-hémax. Les facteurs induisant une telle plasticité dans la zone externe de l'éminence médiane restent à définir, l'élévation des taux d'œstrogènes plasmatiques entre le soir du diœstrus et le matin du proœstrus pourrait en être l'un des principaux moteurs.

En conclusion, l'ensemble des deux approches démontre définitivement l'existence d'une plasticité morphologique stéroïdo-dépendante de la zone externe de l'éminence médiane permettant aux terminaisons à GnRH d'accéder à l'espace péricapillaire le jour du proœstrus. Les principaux protagonistes de cette plasticité semblent être les terminaisons nerveuses à GnRH, les tanocytes et l'endothélium des capillaires portes hypophysaires.



## II. Expression d'un récepteur sérine-thréonine kinase au TGF $\beta$ et à l'activine dans les neurones à GnRH, les tanocytes et les capillaires porte.

Suite à la mise en évidence de l'existence d'une plasticité morphologique dans la zone externe de l'éminence médiane régulant l'accès des terminaisons à GnRH aux vaisseaux portes, notre deuxième objectif a été d'essayer de déterminer les éventuels facteurs capables d'induire de tels phénomènes de plasticité. Partant de l'hypothèse que les principaux protagonistes des phénomènes de plasticité dans la zone externe de l'éminence médiane pourraient être les tanocytes, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux facteurs susceptibles d'être synthétisés et/ou d'agir sur ces derniers. De plus nous noterons que les tanocytes de l'éminence médiane expriment le récepteur aux œstrogènes (Langub et Watson, 1992).

L'un des principaux facteurs actuellement connu pour réguler l'activité sécrétoire des neurones à GnRH est le TGF $\alpha$ , facteur de croissance très étudié par l'équipe d'Ojeda. Le TGF $\alpha$  et son récepteur sont exprimés dans les tanocytes de l'éminence médiane (Ma *et al.*, 1992, Ma *et al.*, 1994a), et les stéroïdes gonadiques stimulent l'expression de ce facteur à la fois au niveau de l'aire préoptique et au niveau de l'hypothalamus médiobasal (Ma *et al.*, 1992). Le TGF $\alpha$ , connu pour stimuler la libération de GnRH par des fragments d'éminence médiane (Ojeda *et al.*, 1990) pourrait être l'un des moteurs de la plasticité neuro-gliale observée le jour du proœstrus.

Pour notre part, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au TGF $\beta_1$ , facteur de croissance récemment impliqué dans la modulation de la sécrétion de GnRH et dans l'induction de remaniements morphologiques. En effet, le TGF $\beta_1$  est non seulement connu pour stimuler l'expression de l'ARNm de la GnRH et la sécrétion de la neurohormone par les neurones GT1-1 en culture (Melcangi *et al.*, 1995 ; Galbiati *et al.*, 1996), mais aussi pour induire une réorganisation rapide du cytosquelette d'astrocytes en culture, sans synthèse *de novo* de protéines (Gagelin *et al.*, 1995). A plus long terme le TGF $\beta_1$  intervient aussi sur la synthèse de protéines du cytosquelette astrocytaire telles que la GFAP (Reilly, Maher et Kumari, 1998) et la vimentine (Krhon *et al.*, 1995). L'action du TGF $\beta_1$  sur les tanocytes

implique la présence de récepteurs spécifiques au  $TGF\beta_1$  dans ce type cellulaire. Le but de notre étude a donc été de montrer l'expression d'un récepteur au  $TGF\beta$  dans les tanocytes, mais aussi dans les neurones à GnRH et toutes les aires du diencephale impliquées dans la régulation du système à GnRH.

Grâce à une collaboration avec le Docteur Toru Takumi, nous avons obtenu l'ADNc de l'un des récepteurs du  $TGF\beta_1$ , le récepteur B1. Nous noterons cependant que ce récepteur est aussi celui d'un autre membre de la superfamille des  $TGF\beta$  : l'activine. L'activine est, comme le  $TGF\beta_1$ , une cytokine connue pour moduler l'expression et la sécrétion de la GnRH *in vitro* (Gonzalez-Manchon *et al.*, 1991), mais aussi *in vivo* (Lee et Rivier, 1997 ; Calogero *et al.*, 1998).

La distribution anatomique des cellules hypothalamiques exprimant l'ARNm de B1 a été déterminée par simple hybridation *in situ*. L'ARNm antisens de B1 a été marqué lors de sa transcription par l'incorporation de bases marquées au  $^{35}S$ .

L'étude de l'éventuelle expression de B1 dans les neurones à GnRH a été entreprise par double hybridation *in situ*. A cet effet l'ARNm antisens de B1 a été marqué lors de sa transcription par l'incorporation de bases marquées au  $^{35}S$ , alors que l'ARNm antisens de la GnRH, l'a été par incorporation de bases marquées à la digoxygénine. Les sondes marquées à la digoxygénine sont révélées à l'aide d'anticorps couplés à la phosphatase alcaline et d'une réaction colorimétrique. Les sondes marquées par la radioactivité sont révélées après émulsion photographique.

# Evidence that members of the TGF $\beta$ superfamily might play a key role in the regulation of the GnRH neuroendocrine axis: expression of the type I serine-threonine kinase receptor for TGF $\beta$ and activin in GnRH neurons and in associated hypothalamic areas of the female rat.

VINCENT PREVOT\*, SEBASTIEN BOURET, DOMINIQUE CROIX, TORU TAKUMI, LOTHAR JENNES, VALERIE MITCHELL, JEAN-CLAUDE BEAUVILLAIN

INSERM U422 (V.P., S.B., D.C., V.M., J-C. B.), place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France; Department of Anatomy and Brain Science (T.T), Kobe University School of Medicine, Kobe, Japan; Department of Anatomy and Neurobiology (L.J.), University of Kentucky College of Medicine, Lexington, Kentucky

**Abstract** The present study was designed to determine whether transforming growth factor (TGF)  $\beta$  and/or activin were implied in the regulation of the gonadotropin releasing hormone (GnRH) neuroendocrine axis *in vivo*. In that purpose, single-label *in situ* hybridization histochemistry was used to determine the anatomical distribution of the TGF $\beta$  and activin type I receptor (B1) mRNA in the adult female rat hypothalamic areas that are known to be important sites for the regulation of reproduction; dual-label *in situ* hybridization histochemistry was performed to determine whether B1 mRNA was expressed in GnRH neurons. The results of these studies revealed an extensive distribution of B1 mRNA in the hypothalamic regions including diagonal bands of Broca, preoptic area, arcuate nucleus and median eminence. At the median eminence level B1 mRNA was detected in tanycytes and portal blood capillaries. Dual-label *in situ* hybridization histochemistry revealed that some GnRH neurons expressed B1 mRNA, thus providing evidence that TGF $\beta$  and/or activin can act directly on GnRH neurons to modulate their activity. Together these morphological data provide the evidence that TGF $\beta$  and/or activin may play a crucial role in the regulation of reproduction at the hypothalamic level.

## Introduction

The secretion of gonadotropins is controlled by the hypothalamic hormone GnRH, which is synthesized in neuronal cell bodies diffusely distributed in the preoptic area and secreted from neuroendocrine terminals localized in the external zone of the median eminence. The modulation of the GnRH neuroendocrine axis occurs both at the cell body level, in the preoptic area, and at its release site, in the median eminence, via neuronal (1) glial (2), endothelial (3) and humoral (4) factors.

Recently, it was reported that glial factors, especially transforming growth factors (TGFs), might be able to control GnRH release from median eminence nerve terminals (5,6). Among these growth factors, TGF $\beta_1$  was shown to stimulate both GnRH mRNA expression and GnRH release from hypothalamic cell line GT1-1 *in vitro* (6,7). Otherwise activin, an other member of the TGF $\beta$  superfamily, is also known to modulate GnRH secretion (8,9).

Since the role of TGF $\beta_1$  and activin in the regulation of GnRH activity *in vivo* is unwell known, the purpose of our study was to determine if the type I serine-threonine kinase receptor for TGF $\beta$  and activin (B1) was expressed in the GnRH neurons and/or in the hypothalamic regions implicated in the regulation of their activity, in the female rat. The results provides for the first time the anatomical basis for a likely role of TGF $\beta$  and/or activin in the regulation of the GnRH neuroendocrine axis.

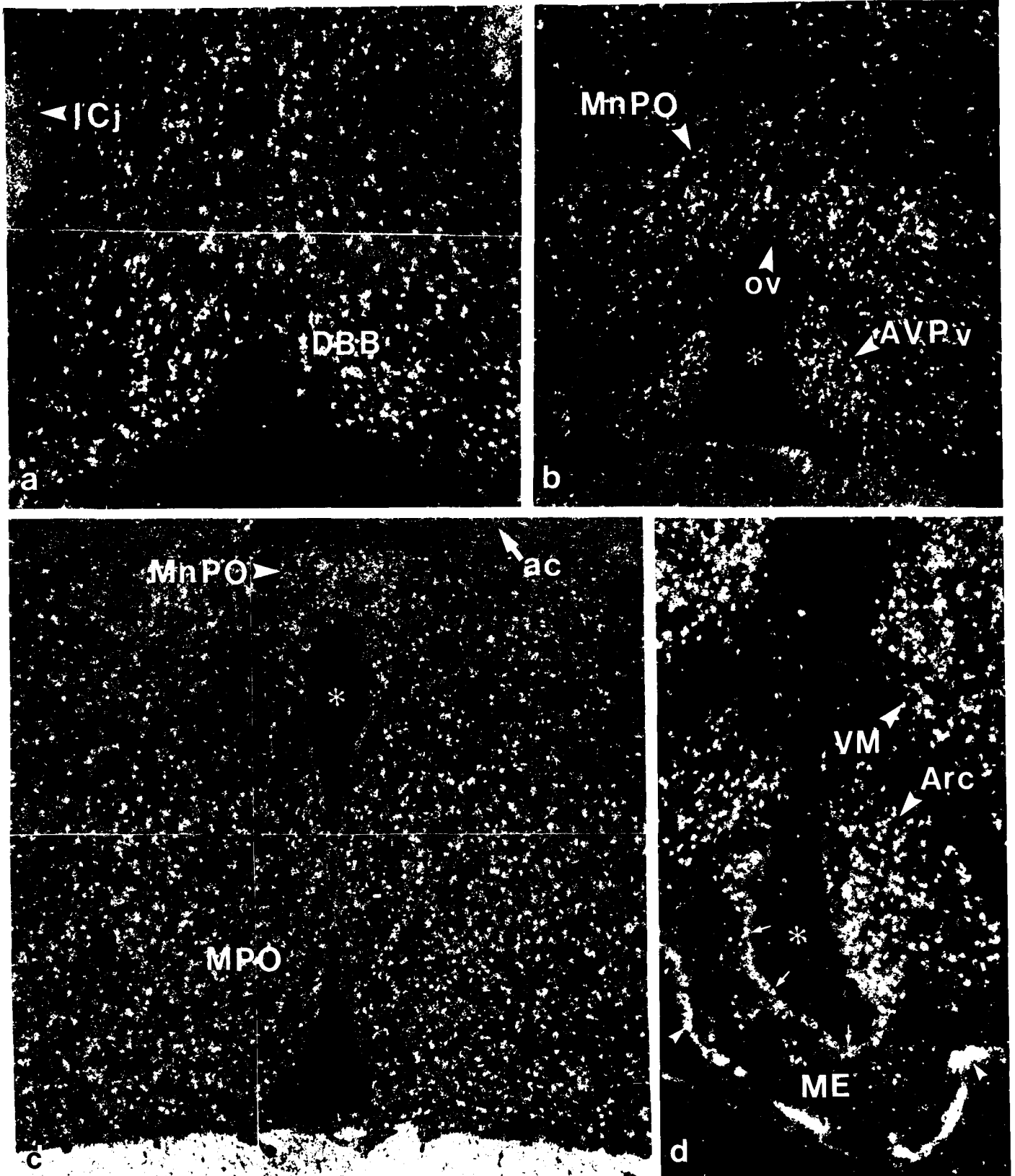
## Material and Methods

**Animals and tissue preparation.** Adult female Wistar rats (n = 4) weighing 250-275 g (CERJ, France) were maintained on a 14 h light, 10 h dark schedule, with food and water available *ad libitum*. After anaesthesia with ketamine (20 mg / kg) / xylazine (0.2 ml / kg), animals were perfused intracardially with 5-10 ml saline followed by 500 ml 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Brains were removed and immersed in the same fixative for 2 h. They were then washed overnight in 0.05 M Coons veronal buffer, (pH 7.4), containing 20% sucrose, embedded in Tissue-Tek (Miles Laboratories, Naperville, IC), and frozen in liquid nitrogen. Frozen 14  $\mu$ m coronal sections were collected onto gelatine-coated slides from the level of 0.2 to -3.8 mm relative to Bregma of the atlas of Paxinos and Watson (10), stored at -80 C until used. All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), regarding mammalian research.

**B1 riboprobe synthesis.** pcDNA I vector containing 2.3 kb XbaI/HindIII fragment of B1 cDNA (11) was linearized by cutting at a single site with XbaI for the antisense probe or HindIII for the sense probe. *In vitro* transcription was performed using the T7 RNA polymerase for the antisense and SP6 RNA polymerase for the sense B1 probes and [<sup>35</sup>S] CTP (Amersham, France).

**GnRH riboprobe synthesis.** GST7 vector containing 0.33 kb BamHI/HindIII of GnRH cDNA was linearized by cutting at a single site with HindIII for antisense and BamHI for sense probes. *In vitro* transcription was performed using T7 and SP6 RNA polymerases in a digoxigenin RNA labelling mixture (Boehringer Mannheim, France) for the antisense and sense GnRH probe, respectively.

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: prevot@biserte.lille.inserm.fr.



**Fig. 1.** Representative autoradiogram of B1 mRNA in the randomly cycled female rat diagonal band of Broca (a), rostral preoptic area (b), medial preoptic area (c) and mediobasal hypothalamus (d) by *in situ* hybridization. Note that B1 mRNA-containing perikarya are numerous in the AVPv (b), in the MnPO (b,c), and in Arc (d). At the ME level (d) both tanycyte perikaryas (arrows) and portal blood capillaries (little arrowhead) are strongly labeled. Abbreviations: ac, anterior commissure; AVPv, anteroventral periventricular nucleus; Arc, arcuate nucleus; DBB, diagonal band of Broca; ME, median eminence; MnPO, median preoptic nucleus; MPO, medial preoptic area; ov, vascular organ of the lamina terminalis; VM, ventromedial hypothalamic nucleus. Asterisk, third ventricle.

*In situ hybridization histochemistry.* Single-label *in situ* hybridization to examine the distribution of B1 in the preoptic region and mediobasal hypothalamus (n = 2), and double-label *in situ* hybridization to determine whether GnRH neurons express B1 (n = 2) following protocols described previously (12,13). Briefly, processed tissues were hybridized with riboprobe-hybridization buffer mix, which contained only the <sup>35</sup>S-labelled T<sup>β</sup>RI cRNA probe (30000 cpm/μl) for the single *in situ* hybridization and <sup>35</sup>S-labelled T<sup>β</sup>RI cRNA probe (30000 cpm/μl) plus the digoxigenin-labeled GnRH cRNA probe (1:200) for the dual *in situ* hybridization. Overnight hybridization at 55 C was followed by RNase treatment, a series of stringent washes, including a high-stringency wash at 60 C. Single hybridized slides were dehydrated in 70% and 100% ethanol in ammonium acetate, and in K5 emulsion (Integra Biosciences, France). Double hybridized slides were incubated with antidigoxigenin antibody conjugated to alkaline phosphatase and stained with NBT and BCIP (Boehringer Mannheim, France). The slides were dehydrated as above and dipped in photographic emulsion. Following a 20-day exposure slides were developed and observed on Axioskop (Zeiss, Germany) under dark-field or bright-field illumination.

### Results and Discussion

Single-label *in situ* hybridization study shows that B1 mRNA is widely expressed throughout the hypothalamic areas strongly implicated in the regulation of the GnRH neuroendocrine axis (Fig. 1). In the diagonal bands of Broca (Fig. 1a), the rostral preoptic area (Fig. 1b), and the medial preoptic area (Fig. 1c) the distribution of the B1 mRNA expressing cells overlaps the distribution of the GnRH neuron cell bodies (14). The strong expression of B1 mRNA in the anteroventral periventricular nucleus (AVPv) is of particular interest since AVPv is the critical brain region where estrogen is thought to act as an inducer of the GnRH/LH surge (15). Confirming a previous result (16), B1 mRNA is strongly expressed in the arcuate nucleus, which is another hypothalamic nucleus highly implicated in the regulation of GnRH neurons activity (15). In the median eminence, B1 mRNA is present in large amounts in the ependymal cells, i.e., tanycytes (Fig. 1d), which probably participate in the regulation of GnRH release from GnRH nerve endings located in the median eminence external zone (17) and in the induction of plastic phenomenon at this level (18). In addition, B1 mRNA is present in the endothelial cells of the portal blood capillaries at the median eminence level (Fig. 1d).

Dual-label *in situ* hybridization study showed that certain GnRH neurons express B1 mRNA (Fig. 2). This result suggest that the B1 receptor could be expressed at the GnRH cell body level, i.e., in the preoptic area, and/or transported to the GnRH nerve ending in the median eminence. Thus, TGF<sup>β</sup><sub>1</sub> and/or activin could directly modulate *in vivo* both GnRH mRNA levels and GnRH release, as it has been shown *in vitro* (6,7,19).



**Fig. 2.** Photomicrograph showing digoxigenin-labeled GnRH neurons (darkly stained) in the preoptic area. Black silver grains mark the presence of B1 mRNA. The black arrow points a GnRH cell that expresses B1 mRNA; black arrowheads points B1 mRNA expressing cells.

Together these results strengthen the hypothesis that members of the TGF<sup>β</sup> superfamily might play a crucial role in the regulation of reproduction at the hypothalamic level. Future investigations will be necessary to determine whether both TGF<sup>β</sup> and activin are implicated in this regulation. Since the B1 receptor is expressed both in the neurons of the hypothalamic areas that control the regulation of the GnRH neuroendocrine axis, i.e., preoptic area and arcuate nucleus, and in the GnRH neurons themselves, its expression might be linked to GnRH secretion. Otherwise, the high expression of B1 mRNA in tanycytes suggests that this receptor could be implicated in the induction of morphological changes in the median eminence external zone which are supposed to control the access of GnRH nerve terminals to the pericapillary space (17). In that way, TGF<sup>β</sup><sub>1</sub>, one of the molecules that could activate the B1 receptor, is known to modulate the expression of astrocytic cytoskeletal proteins such as GFAP (20) and vimentin (21), but also known to induce a rapid cytoskeletal reorganization in cultured astrocytes (22). Of equal importance is the expression of B1 mRNA in the median eminence portal blood capillaries suggesting that the B1 receptor could participate in the endothelial-neuroendocrine signaling pathway recently discovered (3,23) which may be crucial for the regulation of the GnRH release into the portal blood vessels (3).



### Acknowledgments

This work was supported by FEDER (LARC network) and the University of Lille II.

### References

1. **Kalra SP** 1986 Neural circuitry involved in the control of LHRH secretion: a model for preovulatory LH release. *Frontiers in neuroendocrinology*, Vol 9 (Martini L, Ganong WF, eds), New York: Raven, 31-75.
2. **Ojeda SR** 1994 The neurobiology of mammalian puberty: has the contribution of glial cells been underestimated? *J NIH Res* 6:51-56.
3. **Prevot V, Croix D, Rialas CM, Poulain P, Fricchione GL, Stefano GB, Beauvillain JC** 1999 Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates GnRH release from rat median eminence via a membrane receptor. *Endocrinology* 140: in press
4. **Fink G** 1994 Molecular principles from neuroendocrine models: steroid control of central neurotransmission. *Prog Brain Res* 100:139-147
5. **Ma YJ, Berg-von der Emde K, Rage F, Wetsel WC, Ojeda SR** 1997 Hypothalamic astrocytes respond to transforming growth factor-alpha with the secretion of neuroactive substances that stimulate the release of luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 138:19-25.
6. **Melcangi RC, Galbiati M, Messi E, Piva F, Martini L, Motta M** 1995 Type 1 astrocytes influence luteinizing hormone-releasing hormone release from the hypothalamic cell line GT1-1: is transforming growth factor-beta the principle involved? *Endocrinology* 136:679-686.
7. **Galbiati M, Zanisi M, Messi E, Cavarretta I, Martini L, Melcangi RC** 1996 Transforming growth factor-beta and astrocytic conditioned medium influence luteinizing hormone-releasing hormone gene expression in the hypothalamic cell line GT1. *Endocrinology* 137:5605-5609
8. **Lee S, Rivier C** 1997 Effect of repeated activin-A treatment on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of the adult male rat. *Biol Reprod* 56:969-975
9. **Calogero AE, Burrello N, Ossino AM, Polosa P, D'Agata R** 1998 Activin-A stimulates hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release by the explanted male rat hypothalamus: interaction with inhibin and androgens. *J Endocrinol* 156:269-274
10. **Paxinos G, Watson C** 1986 The rat brain in stereotaxic coordinates. 2<sup>nd</sup> edn. Sidney: Academic Press
11. **Takumi T, Moustakas A, Lin HY, Lodish HF** 1995 Molecular characterization of a type I serine-threonine kinase receptor for TGF-beta and activin in the rat pituitary tumor cell line GH3. *Exp Cell Res* 216:208-214
12. **Faure-Virelizier C, Croix D, Bouret S, Prevot V, Reig S, Beauvillain JC, Mitchell V** 1998 Effects of estrous cyclicity on the expression of the galanin receptor Gal-R1 in the rat preoptic area: a comparison with the male. *Endocrinology* 139:4127-4139
13. **Mitchell V, Prevot V, Jennes L, Aubert JP, Croix D, Beauvillain JC** 1997 Presence of mu and kappa opioid receptor mRNAs in galanin but not in GnRH neurons in the female rat. *Neuroreport* 8:3167-3172
14. **Silverman AJ, Jhamandas J, Renaud LP** 1987 Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. *J Neurosci* 7:2312-2319
15. **Herbison AE** 1998 Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19:302-330
16. **Morita N, Takumi T, Kiyama H** 1996 Distinct localization of two serine-threonine kinase receptors for activin and TGF-beta in the rat brain and down-regulation of type I activin receptor during peripheral nerve regeneration. *Brain Res Mol Brain Res* 42:263-271
17. **Prevot V, Dutoit S, Croix D, Tramu G, Beauvillain JC** 1998 Semi-quantitative ultrastructural analysis of the localization and neuropeptide content of gonadotropin releasing hormone nerve terminals in the median eminence throughout the estrous cycle of the rat. *Neuroscience* 84:177-191
18. **Chauvet N, Prieto M, Alonso G** 1998 Tanycytes present in the adult rat mediobasal hypothalamus support the regeneration of monoaminergic axons. *Exp Neurol* 151:1-13
19. **Gonzalez-Manchon C, Bilezikjian LM, Corrigan AZ, Mellon PL, Vale W** 1991 Activin-A modulates gonadotropin-releasing hormone secretion from a gonadotropin-releasing hormone-secreting neuronal cell line. *Neuroendocrinology* 54:373-377
20. **Reilly JF, Maher PA, Kumari VG** 1998 Regulation of astrocyte GFAP expression by TGF-beta1 and FGF-2. *Glia* 22:202-210
21. **Krohn K, Laping NJ, Morgan TE, Finch CE** 1995 Expression of vimentin increases in the hippocampus and cerebral cortex after entorhinal cortex lesioning and in response to transforming growth factor beta 1. *J Neuroimmunol* 56:53-63
22. **Gagelin C, Pierre M, Gavaret JM, Toru-Delbauffe D** 1995 Rapid TGF beta 1 effects on actin cytoskeleton of astrocytes: comparison with other factors and implications for cell motility. *Glia* 13:283-293
23. **Prevot V, Rialas CM, Croix D, Salzet M, Dupouy JP, Poulain P, Beauvillain JC, Stefano GB** 1998 Morphine and anandamide coupling to nitric oxide stimulates GnRH and CRF release from rat median eminence: neurovascular regulation. *Brain Res* 790:236-244

Les résultats obtenus par simple hybridation *in situ* montrent que l'ARNm du récepteur B1 est fortement exprimé dans de nombreuses aires impliquées dans la régulation de la reproduction telles que les bandes diagonales de Broca, le noyau préoptique médian, le noyau antéroventral périventriculaire, le noyau arqué et l'éminence médiane. Au niveau de l'éminence médiane, l'ARNm de B1 est exprimé dans les tanocytes et les capillaires du plexus porte.

Les résultats, obtenus par double hybridation *in situ*, montrent que les neurones à GnRH expriment l'ARNm de B1. Ceci suggère que le récepteur B1 pourraient être exprimé au niveau des terminaisons nerveuses de la zone externe de l'éminence médiane.

Ainsi, au niveau de l'éminence médiane, le  $TGF\beta$ , mais aussi l'activine, semblent avoir la potentialité d'agir à la fois sur les tanocytes, les capillaires et vraisemblablement les terminaisons nerveuses à GnRH. Ces observations suggèrent que ces deux facteurs de croissance pourraient être impliqués dans le déclenchement et/ou la régulation des phénomènes de plasticité se déroulant dans cette région au cours du cycle œstral.



### **III. Implication du NO dans la modulation de la sécrétion de GnRH dans la zone externe de l'éminence médiane**

#### **III.1. Libération de GnRH induite par la morphine et l'anandamide via l'activation des récepteurs $\mu_3$ et CB1 et la sécrétion de NO : implication de l'endothélium?**

Notre troisième objectif a été d'étudier l'un des facteurs susceptible de réguler la libération de GnRH au niveau de la zone externe de l'éminence médiane : le NO. Au niveau de l'éminence médiane, l'implication du NO dans la modulation de la sécrétion de certaines hormones hypophysiotropes, telles que la GnRH et le CRF semble être établie (Costa *et al.*, 1993 ; Karanth, Lyson et McCann, 1993 ; Moretto, Lopez et Negro-Vilar, 1993 ; Rettori *et al.*, 1993 ; Raber, Koob et Bloom, 1995 ; Lopez, Moretto et Negro-Vilar, 1997). Cependant, l'origine et la cinétique de sécrétion de ce gaz restent inconnues dans cette région de l'hypothalamus.

Grâce à une collaboration avec le laboratoire du Docteur George Stefano, nous avons pu entreprendre 1) l'étude en temps réel de la sécrétion de NO par des fragments d'EM, après une stimulation par un facteur donné, et 2) de déterminer l'implication directe de cette sécrétion sur la libération de GnRH. Parallèlement, dans le cadre de notre collaboration nous avons aussi déterminé le rôle du NO sur la sécrétion de CRF.

Les travaux de l'équipe de Stefano montrent que la morphine et l'anandamide sont capables de stimuler la sécrétion de NO par les cellules endothéliales via une action spécifique sur des récepteurs activant la NOS endothéliale constitutive (ecNOS) (Stefano *et al.*, 1995 ; Deutsch *et al.*, 1997). Etant donné qu'au niveau de l'éminence médiane, les capillaires portes hypophysaires sont fortement immunoréactifs pour la NOS (Ceccatelli *et al.*, 1992 ; Yamada, Emson et Hokfelt, 1996), nous avons émis l'hypothèse que la morphine et l'anandamide pourraient stimuler la libération de NO par les cellules endothéliales de ces capillaires. Nous avons donc entrepris de réaliser une étude *ex vivo* de l'effet de la morphine

et de l'anandamide sur la sécrétion de NO, de GnRH et de CRF par des fragments d'EM de rats mâles.

Brièvement, trois fragments d'EM sont placés dans un Ependorff contenant un milieu de survie auquel sont ajoutées les différentes drogues étudiées. L'effet de ces dernières sur la sécrétion de NO est mesurée par ampérométrie à l'aide d'une électrode de carbone recouverte d'une membrane qui ne laisse passer que les gaz. Cette électrode est plongée dans le milieu à proximité des tissus. Nous noterons que l'électrode mesure spécifiquement le NO libéré, car sa membrane ne laisse passer que les gaz, et que l'autre neurotransmetteur gazeux produit par le cerveau : le monoxyde de carbone (CO), ne possède pas de potentiel d'oxydo-réduction. En parallèle, la libération de GnRH et de CRF sont mesurées par dosages radioimmunologiques dans le milieu de survie.



Research report

Morphine and anandamide coupling to nitric oxide stimulates GnRH and CRF release from rat median eminence: neurovascular regulation

Vincent Prevot <sup>a</sup>, Christos M. Rialas <sup>b</sup>, Dominique Croix <sup>a</sup>, Michel Salzet <sup>c</sup>, Jean-Paul Dupouy <sup>d</sup>, Pierre Poulain <sup>a</sup>, Jean-Claude Beauvillain <sup>a,\*</sup>, George B. Stefano <sup>b</sup>

<sup>a</sup> INSERM, U422, Unité de Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale, place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

<sup>b</sup> Neuroscience Research Institute, State University of New York at Old Westbury, Old Westbury, NY 11568, USA

<sup>c</sup> Centre de Biologie Cellulaire, Laboratoire de Phylogénie moléculaire des Annélides, EA DRED 1027, Groupe de Neuroendocrinologie des Hirudinés, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>d</sup> Laboratoire de Neuroendocrinologie du Développement, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

Accepted 13 January 1998

Abstract

Nitric oxide (NO) is involved in neurohormonal secretion from median eminence neuroendocrine nerve terminals. We report that stimulation of NO release from median eminence fragments including vascular tissues occurs by  $\mu_3$  receptor activation by morphine, or by cannabinoid type 1 receptor activation by anandamide. The released levels of NO are lower after anandamide than after morphine stimulation. These processes can be blocked by L-NAME, a specific nitric oxide synthase inhibitor, by naloxone for the morphine-stimulated NO release, or SR 141716A, a specific CB1 receptor inhibitor, for the anandamide-stimulated NO release. Furthermore, morphine and anandamide, by this NO dependent process, influences neurohormonal release from median eminence nerve terminals within 10 min. Via this NO dependent process, morphine stimulates both GnRH and CRF release, whereas anandamide selectively stimulates GnRH release. These observations together with previous data suggest that morphine and the anandamide-stimulated NO originates from the vascular endothelium of the portal plexus. These results indicate that endothelial cells of the median eminence may be involved in the release of neurohormones. © 1998 Elsevier Science B.V.

**Keywords:** Nitric oxide; GnRH; CRF; Opiate receptor; Cannabinoid receptor; Opioid; Median eminence; Hypothalamus

1. Introduction

The median eminence (ME) is the common termination field for adeno-hypophysiotropic systems. As a result, it contains a variety of signaling processes, such as gonadotropin releasing hormone (GnRH) and corticotrophin releasing factor (CRF) that control luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH) and adrenocorticotropin (ACTH) release, respectively. Several studies demonstrate that nitric oxide (NO) is involved in the release of GnRH and CRF at the ME external zone [6,14,27,29,33,40,41]. Blockage of NO release inhibits the pulsatile LH secretion in male rats [41] and the induction of the GnRH/LH surge induced by progesterone in estrogen-primed ovariectomized rats [6,33]. NO is involved in

the genesis of pulsatile GnRH release from GnRH neurons [29]. NO is also implicated in interleukin (IL)-2, not IL-1, stimulated CRF release [14,27,40]. The source of NO for these processes remains unknown in the ME. The NO, crucial for the occurrence of the preovulatory GnRH surge, may be of neuronal or endothelial origin; indeed, neuronal nitric oxide synthase (nNOS) immunoreactivity is detected in fibers located in the internal zone of the ME projecting to the neurohypophysis [12,20], whereas endothelial constitutive (ec) NOS is detected in endothelial cells located very close to the neuroendocrine terminals of the ME external zone [9,12,59].

Recently, we demonstrated that morphine stimulates NO release from human endothelial cells [7,31,46,48], invertebrate immunocytes and microglia [28,31] via the  $\mu_3$  opiate receptor subtype [45]. It has also been demonstrated that anandamide stimulates NO release from human endothelial cells [15], invertebrate immunocytes and human

\* Corresponding author. Fax: +33-3-20-62-20-61; E-mail: jcb@biserte.lille.inserm.fr

monocytes [47] via the cannabinoid type 1 (CB1) receptor [15].

In the present study we demonstrate that rat ME fragments, including vascular elements, produces NO in response to morphine and anandamide stimulation. Furthermore, the morphine and anandamide coupled NO release stimulates GnRH and/or CRF release. Interestingly, these actions occur within minutes after drug exposure to the ME fragments *in vitro*. As such, this study represents the first demonstration of a potentially new phenomenon, namely, neurovascular regulation of hypothalamic hormonal signaling.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Experiments were performed on male pathogen-free Wistar rats (CERJ, France), weighing 250–300 g. They were housed four per cage, and were given free access to food and water. All animals were subjected to fixed conditions of lighting (from 0500 h to 1900 h).

### 2.2. Dissection procedure

Animals were sacrificed by decapitation. After rapid removal of the brain, the median eminence and associated vascular tissues were obtained by cutting with Wecker's scissors (Moria, France) the floor of the brain within the following structures: posterior border of the optic chiasm and the anterior border of the mamillary bodies. With this dissection, pieces containing ME were obtained with small bits of arcuate nucleus fragments. Preoptic area fragments were obtained by dissection within the following structures: anterior border of the optic chiasm, posterior border of the optic chiasm, and lateral border of the optic chiasm. The depth of the fragments was approximately 2 mm. The total dissection time was less than 3 min from decapitation.

### 2.3. Incubation system

Median eminence fragments were immersed in Eppendorff tubes containing 1 ml of Krebs–Ringer bicarbonate/glucose buffer (pH 7.4) containing bacitracin (23  $\mu$ M; Sigma) and 100  $\mu$ M phosphoramidon (Sigma) in an atmosphere of 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. Three ME fragments were used for each preparation. Preoptic area fragments, used as control, were treated in the same manner as the ME fragments.

### 2.4. NO determination

The tissue fragments were incubated as described above. NO release was measured directly using an NO-specific amperometric probe (World Precision Instruments, Sara-

sota, FL) as described [30,46,53]. Tip diameter of the probe (25  $\mu$ m) permitted the use of a micromanipulator (Zeiss–Eppendorf) to position the sensor, which was enclosed in a Faraday's chamber, 5  $\mu$ m above the tissue surface. Calibration of the electrochemical sensor was performed by use of different concentrations of a nitrosothiol donor *S*-nitroso-*N*-acetyl-DL-penicillamine (SNAP), as described in detail elsewhere [44]. Baseline levels of NO release were determined by evaluation of NO concentration for 30 min and were subtracted from NO release obtained following morphine stimulation. In regard to the opiate experiments, ME fragments were stimulated with 1  $\mu$ M morphine, a previously tested efficacious dose [46], in absence or presence of naloxone (1  $\mu$ M), *N*<sub>ω</sub>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor; 100  $\mu$ M) and with dynorphin [1–17] (1  $\mu$ M), or [D-Ala<sup>2</sup>,MePhe<sup>4</sup>,Gly(ol)<sup>5</sup>] enkephalin (DAMGO; 1  $\mu$ M), or [D-Ala<sup>2</sup>,Met<sup>3</sup>] enkephalinamide (DAMA; 1  $\mu$ M). All drugs were purchased from Sigma (France). Naloxone, DAMA, and L-NAME were administrated 5 min prior to morphine exposure. In regard to the cannabinoid experiments, ME fragments were stimulated with 1  $\mu$ M anandamide, a previously tested efficacious dose [47], in absence or presence of the CB1-R antagonist SR 141716A (0.1  $\mu$ M), and the NOS inhibitor, L-NAME (100  $\mu$ M). Both L-NAME and SR 141716A were administrated 5 min prior to anandamide exposure. SR 141716A was a gift from Dr. Dale G. Deutsch of the Dept. of Biochemistry at the SUNY at Stony Brook. The concentration of NO gas in solution was measured in real time with computer data acquisition (DUO 18, World Precision Instruments) at a sampling rate of 6/s [30,46]. NO release was evaluated with simultaneous measurement of untreated control ME fragments with a second probe to allow comparison of each treatment group to its own control preparation. Data acquisition was performed by the computer interfaced DUO-18 software (World Precision Instruments). The experimental values were then transferred to Sigma-Plot and -Stat (Jandel, CA) for graphic representation and evaluation.

### 2.5. GnRH and CRF secretion determination

At the end of each experiment, the ME fragments were immediately removed and EDTA was added to the milieu (final concentration of 10<sup>-2</sup> M). GnRH concentrations were measured in duplicate by RIA, according to Nett and Adams' method [35] with minor modifications. Monoiodinated GnRH was isolated using a QAE Sephadex column. Antiserum raised to GnRH-HSA, previously characterized by Barry et al. [2], was produced in rabbit and after absorption by HSA, it was used to a final dilution of 1:140,000. The sensitivity was 1.2 pg/tube and the intraassay variability was 3.4%. CRF was measured by RIA. Tyr-CRF (Bachem, Torrance, CA) was iodinated with <sup>125</sup>I by the chloramine T method [23]. Antiserum raised to

synthetic CRF conjugated to bovine thyroglobulin was produced in rabbit and previously characterized by Tramu et al. [52]; after absorption by thyroglobulin, it was used to a final dilution of 1:32,500. The sensitivity of the assay was 7 pg/tube. Intra and interassay coefficients of variation were 5% and 10%, respectively.

2.6. Statistics

All experiments were repeated a minimum of  $n = 4-5$  times and data obtained were evaluated for significant differences between treatment groups using the one-tailed Student's  $t$ -test, where  $p < 0.05$  was considered to be significantly different. For the NO determinations each individual experiment was performed with its own control.

3. Results

3.1. Morphine-stimulated NO release

Evidence for NO release was obtained by direct measurement of NO levels using a NO-specific amperometric probe following stimulation of ME fragments either with morphine or anandamide. Micromolar morphine was able to stimulate NO release from ME fragments ( $21 \pm 3.2$  nM) within minutes of its application (Figs. 1 and 2), a phenomenon that was naloxone sensitive ( $1 \mu\text{M}$ ; NO level =  $1.6 \pm 0.5$  nM). Morphine exposure resulted in a short burst of NO gas (Fig. 2). This effect was dose-dependent (data not shown). By contrast, the  $\mu$ -selective opioid peptide, DAMGO was without effect (NO level =  $1.9 \pm 0.6$  nM), as was DAMA (NO level =  $1.5 \pm 0.8$  nM; Fig. 2), a  $\delta$ -selective opioid peptide, and dynorphin [1–17] (NO level =  $2.4 \pm 1.0$  nM), a  $\kappa$ -selective opioid peptide. Furthermore, pretreatment of the ME fragments with L-NAME

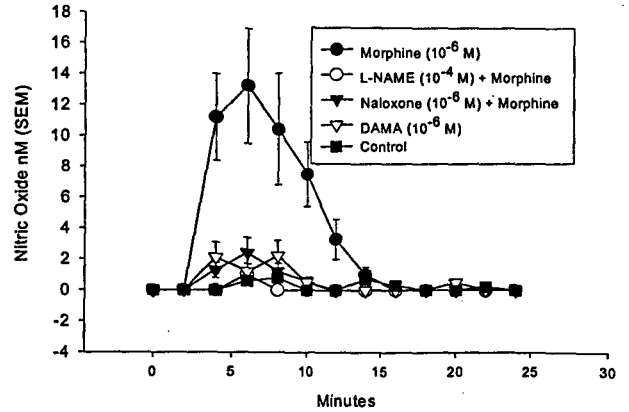


Fig. 2. The antagonism of morphine-stimulated NO production by median eminence fragments by naloxone and L-NAME over time, and lack of NO production by DAMA. The values were obtained as noted in Fig. 1. The actual values were transferred to Sigma Plot (Jandel) and graphed. Morphine was added at time = 2 min. The 4 to 11 min morphine-induced mean NO values are significant when compared to the other treatments at the significance level of  $p < 0.01$ .

( $100 \mu\text{M}$  for 5 min before morphine exposure), a nitric oxide synthase inhibitor, also abolished morphine-induced ( $1 \mu\text{M}$ ) NO release (Fig. 2). Morphine ( $1 \mu\text{M}$ ) did not stimulate NO release from preoptic area fragments (NO level =  $2.3 \pm 1.1$  nM; vehicle  $1.1 \pm 0.8$ ).

3.2. DAMA blocks morphine-stimulated NO release

DAMA, administered 2 min prior to morphine, at  $1 \text{ nM}$  inhibited morphine-stimulated NO release from ME fragments ( $p < 0.05$ ; Fig. 3). Lower concentrations of DAMA ( $0.01$  and  $0.1 \text{ nM}$ ) had no effect on the morphine-stimulated NO release (Fig. 3). Furthermore, the addition of  $1 \text{ nM}$  naltrindole, a  $\delta_2$  opioid receptor agonist, blocked the effect of DAMA inhibition of morphine-stimulated NO

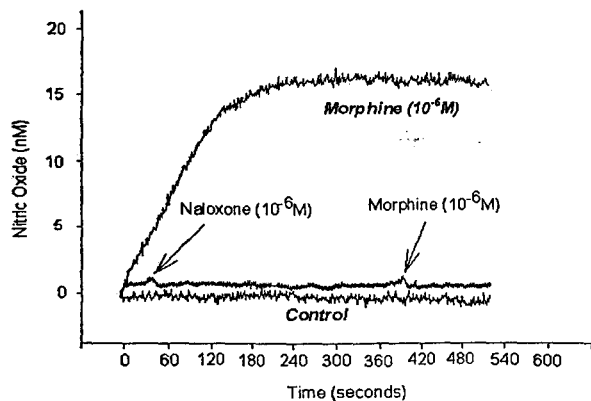


Fig. 1. In vitro stimulation of NO production by morphine and its antagonism by naloxone. Rat median eminence fragments were stimulated with morphine and evaluated for NO release over 10 min. Arrows denote the time of drug application.

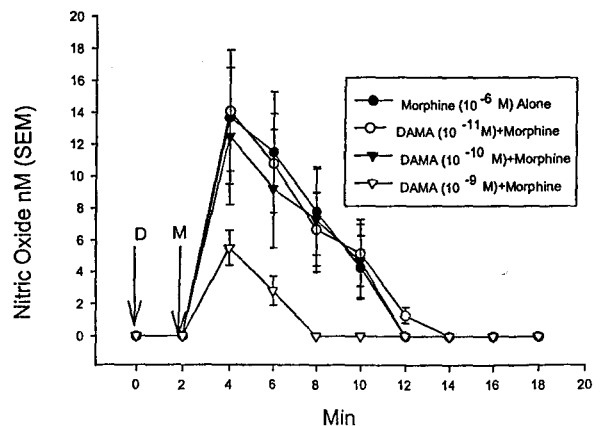


Fig. 3. Morphine-stimulated NO release is partly inhibited by DAMA ( $1 \text{ nM}$ ). The values were obtained as noted on Figs. 1 and 2. Arrows, time of drug addition. D: DAMA; M: morphine.



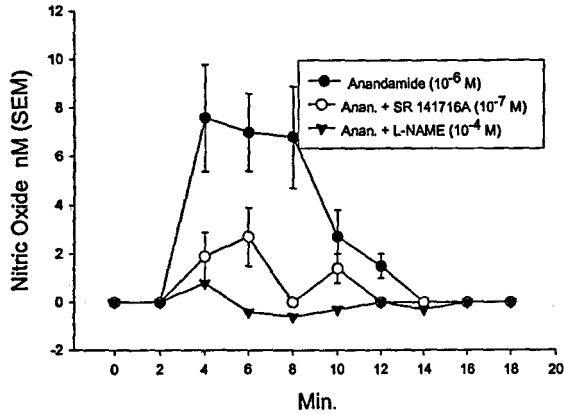


Fig. 4. The antagonism of anandamide-stimulated NO production by median eminence fragments by SR 141716A and L-NAME over time. The values were obtained as noted in Figs. 1 and 2. Anandamide was added at time = 2 min. The 4 to 11 min anandamide-stimulated mean NO values are significant when compared to the other treatments at the significance level of  $p < 0.01$ .

release (1  $\mu\text{M}$  morphine alone at 4 min, NO level =  $13.8 \pm 4.1$  nM; 1 nM DAMA alone, NO level =  $1.5 \pm 0.8$  nM; DAMA plus morphine with DAMA given first by 2 min, NO level =  $5.2 \pm 1.4$  nM; DAMA plus morphine plus naltrindole 1 nM, given 2 min to DAMA, NO level =  $12 \pm 3.4$  nM and  $p < 0.05$  compared to other values).

### 3.3. Anandamide-stimulated NO release

Micromolar anandamide was able to stimulate the ME fragments to produce NO within 2 min of its application (Fig. 4). The CB1 antagonist SR 141716A significantly decreased the effect of anandamide while the NOS in-

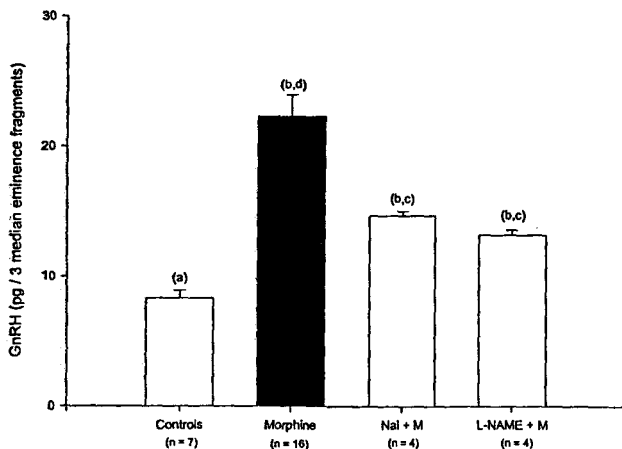


Fig. 5. In vitro stimulation of GnRH release from median eminence fragments by morphine (M; 1  $\mu\text{M}$ ) (black column). Morphine-stimulated GnRH release is antagonized by naloxone (Nal, 1  $\mu\text{M}$ ) indicating that morphine acts via a receptor mediated process, and is inhibited by L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) indicating that the transduction pathway occurs via NO release (white columns). In this figure, the height of the column represents the mean, and the vertical line represents S.E.M. (a vs. b and c vs. d are significantly different,  $p < 0.05$ ).

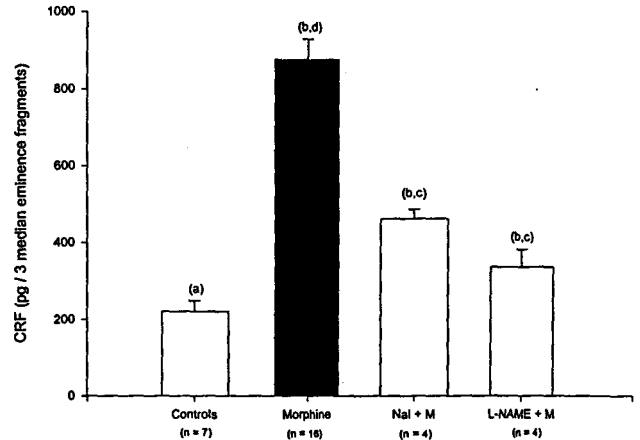


Fig. 6. In vitro stimulation of CRF release from median eminence fragments by morphine (M; 1  $\mu\text{M}$ ) (black column). Morphine-stimulated CRF release is antagonized by naloxone (Nal, 1  $\mu\text{M}$ ) indicating that morphine acts via a receptor mediated process, and is inhibited by L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) indicating that the transduction pathway occurs via NO release (white columns). In this figure, the height of the column represents the mean, and the vertical line represents S.E.M. (a vs. b and c vs. d are significantly different,  $p < 0.05$ ).

hibitor, L-NAME abolished anandamide-stimulated NO release from ME fragments ( $p < 0.05$ ; Fig. 4).

### 3.4. Morphine stimulates a rapid GnRH and CRF secretion from median eminence fragments

Morphine (1  $\mu\text{M}$ ), as SNAP (1  $\mu\text{M}$ , NO donor), induced a dramatic increase in GnRH and CRF release (Figs. 5-8) that occurred within 10 min of its exposure to ME fragments. This morphine induced GnRH and CRF release ( $p < 0.0001$  for both) was antagonized by naloxone (1  $\mu\text{M}$ ) ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively) and inhibited by L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0.01$  for both; Figs. 5 and 6). Interestingly, in the presence of both naloxone

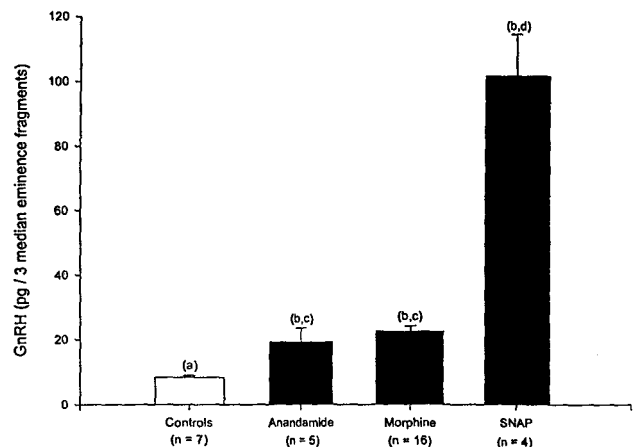


Fig. 7. In vitro stimulation of GnRH release from median eminence fragments by anandamide (1  $\mu\text{M}$ ), morphine (1  $\mu\text{M}$ ) and SNAP (1  $\mu\text{M}$ ). a vs. b and c vs. d,  $p < 0.05$ .

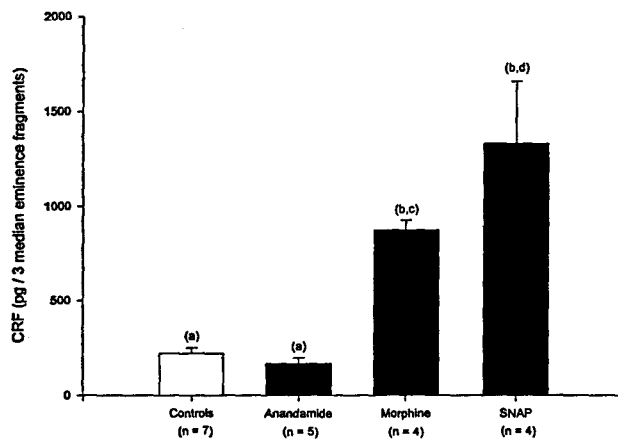


Fig. 8. In vitro stimulation of CRF secretion from median eminence fragments by morphine (1  $\mu$ M) and SNAP (1  $\mu$ M), but not by anandamide (a vs. b and c vs. d,  $p < 0.05$ ).

and L-NAME, the GnRH levels were still significantly higher than those of the control, indicating possible opioid receptor cross-talk (Figs. 5 and 6). SNAP-stimulated GnRH and CRF release was significantly higher than the morphine-stimulated GnRH and CRF release ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.05$ , respectively; Figs. 7 and 8).

### 3.5. Anandamide stimulates GnRH but not CRF secretion from median eminence fragments

Anandamide (1  $\mu$ M) induced a dramatic increase in GnRH secretion ( $p < 0.05$ ; Fig. 7) but not CRF secretion (Fig. 8) from ME fragments. The anandamide-stimulated GnRH release occurs as that of morphine, within 10 min. After the stimulation of the ME with anandamide, GnRH levels were comparable to those obtained after morphine stimulation.

## 4. Discussion

The results of the present in vitro study demonstrate that the rat ME fragments produce NO, a signaling molecule that has been involved in neuroendocrine secretion (see Refs. [8,26]). NO production is stimulated from ME fragments that include vascular endothelia by morphine in a naloxone antagonizable manner and in a L-NAME sensitive process. Opioid peptides, including  $\mu$  select molecules, do not stimulate in vitro NO production from ME. This profile, demonstrating opiate alkaloid-selective sensitivity and opioid peptide insensitivity, is characteristic of the presence of the  $\mu_3$  opiate receptor previously characterized by Stefano et al. [45]. Morphine-stimulated ME NO production, therefore, appears to be mediated by the  $\mu_3$  opiate alkaloid-selective receptor. Furthermore, opioid peptides appear to uncouple the morphine-stimulated release of NO, indicating the dynamic nature of the process. Indeed, DAMA preincubation dimin-

ished the morphine-stimulated NO release via the  $\delta_2$  opioid receptor as demonstrated by naltrindole blockade of DAMA's action. We show that morphine coupled NO release stimulates GnRH and CRF secretion as does the NO-donor SNAP from ME fragments. The morphine induced GnRH and CRF release was antagonized by naloxone and L-NAME, indicating that the morphine-stimulated GnRH and CRF release occurred via the  $\mu_3$  receptor-mediated NO release process. Additionally, anandamide, in a L-NAME sensitive process, also stimulates NO release from ME fragments. SR 141716A antagonizes the anandamide-stimulated release of NO indicating that this process is mediated by the CB1 receptor [15]. Unlike morphine, anandamide coupled NO release stimulates GnRH secretion, but not CRF secretion.

Recent studies have demonstrated the presence of the  $\mu_3$ -NO coupling in human endothelial cells [46] and in glial cells [28]. In the ME two types of NOS exist: a nNOS located in fibers of the ME internal zone [12,20]; and a ecNOS located in the vascular endothelia of the pituitary portal vessels [9,12,59]. Furthermore, NOS appears not to be detected in glial cells under physiological conditions [18] and has never been detected in ME glia. In our hands, NO release was not stimulated by morphine from preoptic area fragments which exhibits intense nNOS immunoreactivity around GnRH cell bodies [38,59]. This strongly suggests that nNOS is not involved in the morphine coupled NO-stimulated GnRH and CRF secretion from ME fragments, and that ecNOS is involved in this phenomenon. This is consistent with the  $\mu_3$  endothelial presence [46]. Our negative result, in the preoptic area, is in accordance with the work of Pu et al. [38] showing that morphine inhibited cGMP efflux in the rat preoptic area which is a reliable index of NO output in vivo [54]. Thus, rather than stimulate NO release as it does in median eminence, morphine inhibits NO production at the preoptic area level via an inhibition of nNOS activity [38]. These data dismiss the implication of nNOS activity in the morphine-stimulated NO release from median eminence fragments, and further support that the location of the opiate alkaloid coupling to NO release is vascular. The endothelial-NO implication in neuroendocrine processes is strengthened by a previous work showing that central administration of antisense oligonucleotides to ecNOS, in estrogen-primed ovariectomized rats treated with progesterone [1], suppresses the progesterone-induced LH surge whereas the effect obtained with nNOS antisense is not evident. As NO is involved in the genesis of pulsatile GnRH release [29], we surmise that ecNOS antisense oligonucleotides might have inhibited the expression of the ecNOS in the ME endothelia leading to an inhibition of NO release. In conclusion, these data, taken together, indicate that the NO released in response to morphine is vascular in origin.

The morphine-induced GnRH release reported in the present study, at first glance, appears to contradict earlier

studies [13,39]. In vivo studies show that high dose morphine inhibits GnRH and LH surge in female rats on the day of proestrus [13,39], whereas low dose exposure either increases LH [39,60] or decreases it [13,24]. Taken together, it is possible that long-term morphine action involves other opioid peptide receptors acting via another process, i.e., inhibiting nNOS in the preoptic area. Moreover, we recently demonstrated that constitutive NOS NO can inhibit inducible NOS and its longer lasting NO release [48]. We surmise, the contradiction regarding morphine actions arises in experimental differences. Experiments designed to examine prolonged actions of the opiate alkaloids frequently miss earlier critical processes that regulate the expression of the long term process [48]. Indeed the complexity is even found in the present study. L-NAME and naloxone completely blocked ME NO release, however, they only partially diminish GnRH release. The answer to this problem may be in the presence of other opioid receptors that may also modulate GnRH and CRF release, i.e.,  $\delta_2$ , that exhibits a poor affinity for naloxone. In invertebrates both morphine and opioid peptides inhibit the release of ganglionic dopamine [49]. However, morphine performed its action via a NO dependent process and the opioid peptides performed the same action via a non-NO dependent process. Thus, we can safely conclude that opioid receptor cross-talk may be occurring, indicating a opioid and opiate alkaloid convergence on GnRH and CRF release modulation.

In morphine-stimulated release of CRF, the present study extends the observation of Nikolarakis et al. [36,37] and those of Buckingham [11] by demonstrating that morphine's action may occur via the release of NO. We surmise the NO-stimulated release of CRF in turn induces the release of ACTH. These observations are strengthened by the fact that a potent NO-donor, SNAP, mimics morphine's action. Our results are in disagreement with the results of Costa et al. [14] in which NO donors and precursors did not alter basal CRF release from hypothalamic explants, but are in accordance with those of Raber et al. [40] showing that nitroprusside, an NO generator, induces CRF release. This difference again can be explained by the acute nature of the present experiments.

Cannabinoid receptors are present in various brain areas [21,32,34] with a neuronal localization [22]. Interestingly, binding studies demonstrated a quasi absence of sites in the nervous part of ME [21], dismissing the implication of neuronal CB1 receptor (CB1-R) in the anandamide-stimulated NO release from ME fragments. Consequently, we surmise that the action of anandamide occurs via CB1 receptors located on endothelia. This hypothesis is strengthened by the finding that RT/PCR of rat endothelial cells revealed transcripts for CB1-R that binds anandamide [15]. Rat and human endothelial cells exhibit specific, high-affinity binding of anandamide that initiates vasodilatation via NO that can be blocked by NOS inhibition or exposure to the CB1-R antagonist SR 141716A

[15,48]. The ability of anandamide to release NO was first noted in invertebrate immunocytes and human monocytes [47]. Regarding the select release of GnRH from ME fragments by anandamide, previous in vivo studies [25,55,58] with  $\delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), the main psychoactive component of marijuana, appear to contradict the results of the present study. Some demonstrated that high dose THC suppresses plasma LH and stimulates ACTH levels via CRF release stimulation [25,55]. Another work showed that low dose THC alters pituitary LH release via an inhibition of GnRH release [58]. The presence of cannabinoid receptors in the paraventricular nucleus [21] and the fact that anandamide induces FOS expression here [57], suggests that anandamide has a neuronal action on this brain area that contains the CRF cell bodies. Conversely, absence of cannabinoid receptors on neuronal material in the ME [21,22] and their existence in endothelial cells [15] suggest a vascular action of anandamide at the ME, thus supporting our results. Consequently, anandamide might have both a fast action on median eminence neuroendocrine terminals implicating NO release from portal vessel endothelial cells, via a CB1 receptor-eNOS process [15,47], and a more delayed action on paraventricular nucleus neurons implicating proteic synthesis.

Our findings raise another important question, how can the ME fragments distinguish anandamide-stimulated NO release from that of morphine, as noted by the cannabinoid selective release of GnRH? We surmise that the answer lies in the amount of NO released since morphine stimulates greater peak NO levels than anandamide. We first noted that morphine releases more NO than anandamide in invertebrate and human immune cells [47]. This observation was extended to include human endothelial cells [48]. In the present study, we think that the same phenomenon is occurring, namely, that a higher level of NO gas production can influence more processes before being 'consumed', i.e., hemoglobin. This is also evident in the higher levels of the hormones released after SNAP exposure which represents almost a total immersion in NO compared to a select release at coupled receptor sites. Additionally, after exposure to opiate alkaloids, endothelial cells in vitro change their conformation and become more rounded [31]. This observation is important in that to the degree this is possible in vivo, a slight retraction of the cytoplasm would allow for greater permeability, i.e., signal molecule trafficking.

In the present study, the release of NO from the median eminence was able to modulate neuroendocrine secretion. The fact that the processes were mediated either by  $\mu_3$  receptor or by CB1 receptor suggest that our results are physiologically significant (Fig. 9). As regard the  $\mu_3$  receptor, morphine could be the endogenous agonist since nonpeptide opioids recognized by antisera raised against morphine has been isolated from beef brain [19,56]. Recently, Bianchi et al. [4,5], by immunocytochemical analy-

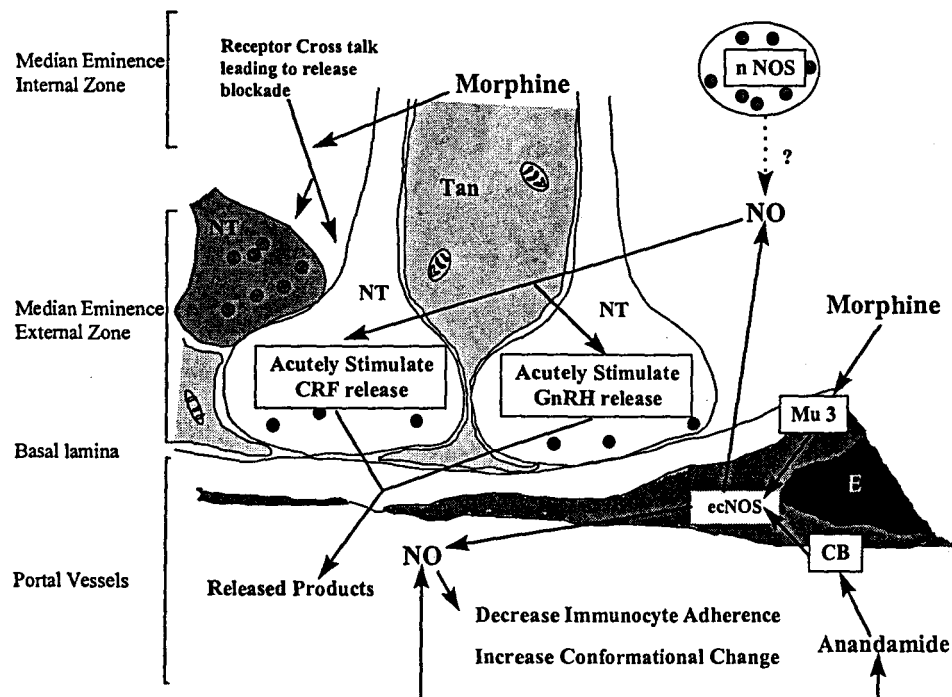


Fig. 9. Schematic representation of the possible interaction of morphine and anandamide with endothelial cells of the pituitary portal vessels and role of the nitric oxide (NO) of endothelial origin on GnRH and CRF release from median eminence neuroendocrine terminals. For detailed description, see Section 4. NT, nerve terminal; Tan, tanycyte; E, endothelial cell; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; ecNOS, endothelial constitutive nitric oxide synthase; CB, cannabinoid receptor;  $\mu_3$ ,  $\mu_3$  receptor.

sis, argued for the presence of reaction products to morphine in perikarya, fibers, and terminals of neurons in discrete areas of the rat brain, including the hypothalamus. The observation of a morphine-like compound in the rat hypothalamus [5] is important since, as noted earlier, morphine increases the plasma levels of CRF, ACTH and glucocorticoid [3,10,17,36,37,42]. In 1994, Stefano and Scharrer [50] surmised that an indirect pathway for the suppression of immune processes by morphine can be postulated; namely that via the hypothalamic–hypophyseal–adrenal axis since CRF, ACTH and glucocorticoids inhibit immunocyte activities (see Ref. [51]). In this case, the final outcome, immunosuppression, must be visualized to be initiated by a stimulatory signal from a morphine-like compound, furnished by the brain, to CRF-producing neurons of the hypothalamus, the first way station in this axis. As regards CB1 receptor, anandamide (arachidonylethanolamide) is an endogenous agonist of this receptor that was isolated from porcine brain [16]. Given this, the present report strongly suggests that the microvascular brain endothelial cells are involved in the modulation of hypothalamic neurosecretory processes. Thus, vascular neuroimmune phenomena may represent another regulatory process to ensure appropriate signaling of organismal homeostasis.

In conclusion, the endothelial cells of the pituitary portal vessels, located at the proximity of GnRH and CRF nerve terminals (Fig. 9), appear to be a major source of

NO that is involved in the control of a rapid GnRH and CRF secretion and thus, in reproduction and neuroimmunity. The control of neuroendocrine secretion by endothelial NO in response to  $\mu_3$  and CB1 stimulation represents a new concept involving autoimmunovascular regulation [43].

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Mrs. G. Mortreux for her excellent technical assistance in the radioimmunoassays and Doctor Messines (Laboratory Sanofi-Francopria, Paris) for the generous gift of morphine-sulfate. This work was supported by the following grants: NIMH COR 17138, NIDA 09010 and the Research Foundation and Central Administration of the State University of New York (GBS), NIH Fogarty INT 00045 (MS and GBS), the University of Lille II and the FEDER.

#### References

- [1] K. Aguan, V.B. Malesh, L. Ping, G. Bhat, D.W. Brann, Evidence for physiological role for nitric oxide in the regulation of the LH surge: effect of central administration of antisense oligonucleotides to nitric oxide synthase, *Neuroendocrinology* 64 (1996) 449–455.
- [2] B.L. Barry, M.P. Dubois, P. Poulain, Immunofluorescence study of

- the preoptico-fundibular LRF neurosecretory pathway in the normal, castrated, or testosterone treated male guinea pig, *Endocrinology* 133 (1974) 1911–1914.
- [3] B.M. Bayer, C.M. Flores, Effects of morphine on lymphocyte function: possible mechanisms of interaction, in: R.R. Watson (Ed.), *Drugs of Abuse and Immune Function*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990, pp. 151–174.
  - [4] E. Bianchi, C. Alessandrini, M. Guarna, A. Tagliamonte, Endogenous codeine and morphine are stored in specific brain neurons, *Brain Res.* 627 (1993) 210–215.
  - [5] E. Bianchi, M. Guarna, A. Tagliamonte, Immunocytochemical localization of endogenous codeine and morphine, *Adv. Neuroimmunol.* 4 (1994) 83–92.
  - [6] J.J. Bonavera, A. Sahu, P.S. Kalra, S.P. Kalra, Evidence that nitric oxide may mediate the ovarian steroid-induced luteinizing hormone surge: involvement of excitatory amino acids, *Endocrinology* 133 (1993) 2481–2487.
  - [7] T.V. Bilfinger, A. Hartman, Y. Liu, H.I. Magazine, G.B. Stefano, Cryopreserved veins used for myocardial revascularization: a 5 year experience and a possible mechanism for their increased failure, *Ann. Thor. Surgery* 63 (1997) 1063–1069.
  - [8] W. Brann, G.K. Bhat, C.A. Lamar, V.B. Malesh, Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation, *Neuroendocrinology* 65 (1997) 385–395.
  - [9] S. Bredt, P.M. Hwang, S.H. Snyder, Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide, *Nature* 347 (1990) 768–770.
  - [10] H.U. Bryant, B.B. Yoburn, C.E. Inturrisi, E.W. Bernton, J.W. Holaday, Morphine-induced immunosuppression is not related to serum morphine concentrations, *Eur. J. Pharmacol.* 149 (1988) 165.
  - [11] J.C. Buckingham, Secretion of corticotrophin and its hypothalamic releasing factor in response to morphine and opioid peptides, *Neuroendocrinology* 35 (1982) 111–116.
  - [12] S. Ceccatelli, J.M. Lundberg, D.S. Fahrenkrug, D.S. Bredt, S.H. Snyder, T. Hökfelt, Evidence for involvement of nitric oxide in the regulation of hypothalamic portal blood flow, *Neuroscience* 51 (1992) 769–772.
  - [13] M. Ching, Morphine suppresses the proestrous surge of GnRH in pituitary portal plasma of rats, *Endocrinology* 112 (1983) 2209–2211.
  - [14] A. Costa, P. Trainer, M. Besser, A. Grossman, Nitric oxide modulates the release of corticotrophin-releasing hormone from the rat hypothalamus in vitro, *Brain Res.* 2 (1993) 187–192.
  - [15] G. Deutsch, M.S. Goligorsky, P.C. Schmid, R.J. Krebsbach, H.H.O. Schmid, S.K. Das, S.K. Dey, G. Arreaza, Thorup, G.B. Stefano, L.C. Moore, Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney, *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 1538–1546.
  - [16] M.A. Devane, L. Hanus, A. Breuer, R.G. Pertwee, L.A. Stevenson, G. Griffin, A. Mandelbaum, A. Etinger, R. Mechoulam, Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor, *Science* 258 (1992) 1946–1949.
  - [17] R.M. Eisenberg, Plasma corticosterone changes in response to central or peripheral administration of kappa and sigma opiate agonists, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233 (1985) 863–869.
  - [18] U. Forstermann, H. Kleinert, Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 352 (1995) 351–364.
  - [19] A. Goldstein, R.W. Barrett, I.F. James, L.I. Lowney, C. Weitz, L.L. Knipmeyer, H. Rapoport, Morphine and other opiates from beef brain and adrenal, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (1985) 5203–5207.
  - [20] E. Herbison, S.X. Simonian, P.J. Norris, P.C. Emson, Relationship of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat, *J. Neuroendocrinol.* 8 (1996) 73–82.
  - [21] M. Herkenham, A.B. Lynn, M.R. Johnson, L.S. Melvin, B.R. de Costa, K.C. Rice, Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study, *J. Neurosci.* 11 (1991) 563–583.
  - [22] M. Herkenham, A.B. Lynn, L.S. Melvin, B.R. de Costa, E.K. Richfield, Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat, *Brain Res.* 547 (1991) 267–274.
  - [23] W.M. Hunter, F.C. Greenwood, Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity, *Nature* 194 (1962) 495–496.
  - [24] T. Ieiri, H.T. Chen, G.A. Campbell, J. Mietes, Effects of naloxone and morphine on the proestrous surge of prolactin and gonadotropins in the rat, *Endocrinology* 106 (1980) 1568.
  - [25] A.L. Jackson, L.L. Murphy, Role of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the suppression of luteinizing hormone release by delta-9-tetrahydrocannabinol, *Neuroendocrinology* 65 (1997) 446–452.
  - [26] S.P. Kalra, T. Horvath, F. Naftolin, B. Xu, S. Pu, P.S. Kalra, The interactive language of the hypothalamus for the gonadotropin releasing hormone (GnRH) system, *J. Neuroendocrinol.* 9 (1997) 569–576.
  - [27] S. Karanth, K. Lyson, S. McCann, Role of nitric oxide in interleukin 2-induced corticotrophin-releasing factor release from incubated hypothalamic, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 3383–3387.
  - [28] Y. Liu, D. Shenouda, T.V. Bilfinger, M.L. Stefano, H.I. Magazine, G.B. Stefano, Morphine stimulates nitric oxide release from invertebrate microglia, *Brain Res.* 722 (1996) 125–131.
  - [29] F.J. Lopez, M. Moretto, I. Merchenthaler, A. Negro-Vilar, Nitric oxide is involved in the genesis of pulsatile LHRH secretion from immortalized LHRH neurons, *J. Neuroendocrinol.* 9 (1997) 647–654.
  - [30] H.I. Magazine, Detection of endothelial cell-derived nitric oxide: current trends and future directions, *Adv. Neuroimmunol.* 5 (1995) 479.
  - [31] H.I. Magazine, Y. Liu, T.V. Bilfinger, G.L. Fricchione, G.B. Stefano, Morphine-induced conformational changes in immunocytes, endothelial cells and microglia are mediated by nitric oxide, *J. Immunol.* 156 (1996) 4845–4850.
  - [32] L.A. Matsuda, S.J. Lolait, M.J. Brownstein, A.C. Young, T.I. Bonner, Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA, *Nature* 346 (1990) 561–564.
  - [33] M. Moretto, F.J. Lopez, A. Negro-Villar, Nitric oxide regulates luteinizing hormone releasing hormone secretion, *Endocrinology* 133 (1993) 2399–2402.
  - [34] S. Munro, K.L. Thomas, M. Abu-Shaar, Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids, *Nature* 365 (1993) 61–65.
  - [35] T.M. Nett, T.E. Adams, Further studies on the radioimmunoassay of gonadotropin releasing hormone. Effect of radioiodination, antiserum and unextracted serum on levels of immunoreactivity in serum, *Endocrinology* 101 (1977) 1135–1144.
  - [36] K.E. Nikolarakis, A. Pfeiffer, G. Stalla, A. Herz, The role of CRF in the release of ACTH by opiate agonists and antagonists in rats, *Brain Res.* 421 (1987) 373–376.
  - [37] K.E. Nikolarakis, A. Pfeiffer, G. Stalla, A. Herz, Facilitation of ACTH secretion by morphine is mediated by activation of CRF releasing neurons and sympathetic neuronal pathways, *Brain Res.* 498 (1989) 385–388.
  - [38] S. Pu, T.L. Horvath, S. Diano, F. Naftolin, P.S. Kalra, S.P. Kalra, Evidence showing that  $\beta$ -endorphin regulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) efflux: anatomical and functional support for an interaction between opiates and nitric oxide, *Endocrinology* 138 (1997) 1537–1543.
  - [39] C.N. Pang, E. Zimmermann, C.H. Sawyer, Morphine inhibition of the preovulatory surges of plasma luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in rat, *Endocrinology* 101 (1977) 1726–1732.
  - [40] J. Raber, G.F. Koob, F.E. Bloom, Interleukin-2 (IL-2) induces corticotrophin-releasing factor (CRF) release from the amygdala and involves a nitric oxide-mediated signaling; comparison with the hypothalamic response, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272 (1995) 815–824.

- [41] V. Rettori, N. Belova, W.L. Dees, C.L. Nyberg, M. Gimeno, S.M. McCann, Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 10130–10134.
- [42] E.M. Smith, T.K. Hughes, F. Hashemi, G.B. Stefano, Immunosuppressive effects of ACTH and MSH and their possible significance in human immunodeficiency virus infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (1992) 782–786.
- [43] G.B. Stefano, Autoimmunovascular regulation: morphine-stimulated nitric oxide release, *J. Neuroimmunol.*, 1998, in press.
- [44] G.B. Stefano, V.B. Christensen, E. Tonnesen, Y. Liu, T.K. Hughes, T.V. Bilfinger, Interleukin 10 stimulation of endogenous nitric oxide release from human saphenous veins diminishes immunocyte adherence, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 30 (1997) 90–95.
- [45] G.B. Stefano, A. Digenis, S. Spector, M.K. Leug, T.V. Bilfinger, M.H. Makman, B. Scharrer, N.N. Abumrad, Opiate-like substances in an invertebrate, and opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 11099–11103.
- [46] G.B. Stefano, A. Hartman, T.V. Bilfinger, H.I. Magazine, Y. Liu, F. Casares, M.S. Goligorsky, Presence of the  $\mu_3$  opiate receptor in endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 30290–30293.
- [47] G.B. Stefano, Y. Liu, M.S. Goligorsky, Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia and human monocytes, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 19238–19242.
- [48] G.B. Stefano, M. Salzet, H.I. Magazine, T.V. Bilfinger, Antagonist of LPS and IFN- $\gamma$  induction of iNOS in human saphenous vein endothelium by morphine and anandamide by nitric oxide inhibition of adenylate cyclase, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1998, in press.
- [49] G.B. Stefano, B. Salzet, C.M. Rialas, M. Pope, A. Kustka, K. Neenan, P. Pryor, M. Salzet, Morphine and anandamide-stimulated nitric oxide production inhibits presynaptic dopamine release, *Brain Res.* 763 (1997) 63–68.
- [50] G.B. Stefano, B. Scharrer, Endogenous morphine and related opiates, a new class of chemical messengers, *Adv. Neuroimmunol.* 4 (1994) 57–68.
- [51] G.B. Stefano, E.M. Smith, Adrenocorticotropin—a central trigger in immune responsiveness: tonal inhibition of immune activation, *Med. Hypotheses* 46 (1996) 471–478.
- [52] G. Tramu, D. Croix, A. Pillez, Ability of the CRF-immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus to produce a vasopressin-like material. Immunohistochemical demonstration in adrenalectomized guinea pigs and rats, *Neuroendocrinology* 37 (1983) 467–469.
- [53] H. Tsukahara, D.V. Gordienko, M.S. Goligorsky, Continuous monitoring of nitric oxide release from human umbilical vein endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193 (1993) 722.
- [54] F. Vallebuona, M. Raiteri, Extracellular cGMP in the hippocampus of freely moving rats as index of nitric oxide (NO) synthase activity, *J. Neurosci.* 14 (1994) 134–139.
- [55] J. Weidenfeld, S. Feldman, R. Mechoulam, Effect of the brain constituent anandamide, a cannabinoid receptor agonist, on the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the rat, *Neuroendocrinology* 59 (1994) 110–112.
- [56] J. Weitz, L.I. Lowney, K.F. Faull, G. Feister, A. Goldstein, Morphine and codeine from mammalian brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 (1986) 9784–9788.
- [57] T. Wenger, K.A. Jamali, C. Juaneda, J. Leonardelli, G. Tramu, Arachidonyl ethanolamide (anandamide) activates the parvocellular part of hypothalamic paraventricular nucleus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237 (1997) 724–728.
- [58] T. Wenger, V. Rettori, G.D. Snyder, S. Dalterio, S.M. McCann, Effect of delta-9-tetrahydrocannabinol on the hypothalamic–pituitary control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in adult male rats, *Neuroendocrinology* 46 (1987) 488–493.
- [59] K. Yamada, P. Emson, T. Hökfelt, Immunohistochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat hypothalamus and colocalization with neuropeptides, *J. Chem. Neuroanat.* 10 (1996) 295–331.
- [60] E. Zimmerman, C.N. Pang, Acute effects of opiate administration on pituitary gonadotropin and prolactin release, in: D.H. Ford, D.H. Clouet (Eds.), *Tissue Responses to Addictive Drugs*, Spectrum Publ., New York, 1976, p. 517.

Les résultats de cette étude montrent que les fragments d'éminence médiane sont capables de synthétiser et de libérer du NO. Cette sécrétion de NO est mesurée dans les secondes qui suivent l'addition de molécules telles que la morphine et l'anandamide qui agissent sur des récepteurs spécifiques,  $\mu_3$  et CB1 (récepteur cannabinoïde type 1) respectivement. Le récepteur de type  $\mu_3$  a été caractérisé pharmacologiquement par Stefano *et al.* en 1993, comme étant un récepteur aux opiacés, insensible aux peptides opioïdes endogènes.

Etant donné la rapidité de l'action de la morphine et de l'anandamide sur la sécrétion de NO, leurs récepteurs sembleraient être directement couplés à une NOS constitutive. Nous noterons que la morphine entraîne une libération de NO deux fois plus importante que l'anandamide.

Les résultats montrent, par ailleurs, que les agonistes du récepteur  $\delta$  aux peptides opioïdes endogènes inhibent la sécrétion de NO induite par la morphine, suggérant qu'il existe des interactions dynamiques entre les différents systèmes opioïdes.

Enfin, les résultats montrent que la morphine stimule une libération rapide de GnRH et de CRF dans le milieu, dans les dix minutes qui suivent son addition. Cette libération de GnRH et de CRF, induites par la morphine, passe via l'activation de son récepteur et la sécrétion de NO, car cet effet est antagonisé par la naloxone et est inhibé par le L-NAME, un inhibiteur spécifique de la NOS.

L'anandamide, cette molécule ne stimule que la libération de GnRH. L'absence d'une libération de CRF suite à une sécrétion de NO induite par l'anandamide pourrait s'expliquer par le fait que la sécrétion de NO engendrée par l'anandamide est approximativement deux fois moins importante que celle engendrée par la morphine. Ainsi les terminaisons nerveuses à CRF ne pourraient être sensibles qu'à des concentrations élevées de NO. Cette dernière observation suggère une modulation sélective de la libération de certaines neurohormones en fonction des taux de NO sécrétés.

### III.2. Libération de GnRH induite par l'œstradiol via l'activation d'un récepteur membranaire et la sécrétion de NO d'origine endothéliale

L'étude précédente nous a permis de déterminer que l'éminence médiane était capable de sécréter du NO susceptible de moduler la sécrétion de GnRH. La libération de NO a été notamment obtenue via l'action de la morphine sur les récepteurs aux opiacés de type  $\mu_3$ . L'intervention d'une "morphine-like endogène" agissant physiologiquement sur la libération de GnRH reste cependant très hypothétique. Par contre, de nombreux arguments nous ont fait penser que l'œstradiol pourrait être impliquée dans la synthèse et la libération de NO au niveau de l'éminence médiane. En effet, l'œstradiol et non seulement connue pour moduler l'expression de la nNOS et de l'ecNOS via une action génomique (Weiner *et al.*, 1994 ; Hayashi *et al.*, 1995), mais aussi pour stimuler une sécrétion rapide de NO par les cellules endothéliales (Lantin-Hermoso *et al.*, 1997). De ce fait, nous avons envisagé que la  $17\beta$ -œstradiol puisse stimuler la sécrétion de NO par des fragments d'EM, via une action sur les capillaires du plexus porte hypophysaire.

Le but de ce travail a donc été de rechercher :

- 1) Si l'œstradiol pouvait provoquer une libération de NO lorsqu'elle était appliquée sur des fragments d'éminence médiane.
- 2) Par quel mécanisme l'œstradiol pouvait éventuellement agir.
- 3) Déterminer l'origine du NO sécrété.

La méthode utilisée, afin de vérifier notre hypothèse, est identique à celle énoncée pour l'expérience précédente.



# Estradiol Coupling to Endothelial Nitric Oxide Stimulates Gonadotropin-Releasing Hormone Release from Rat Median Eminence Via a Membrane Receptor\*

VINCENT PREVOT, DOMINIQUE CROIX, CHRISTOS M. RIALAS,  
PIERRE POULAIN, GREGORY L. FRICCHIONE, GEORGE B. STEFANO, AND  
JEAN-CLAUDE BEAUVILLAIN

INSERM, U-422, Unité de Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale (V.P., D.C., P.P., J.-C.B.), 59045 Lille Cedex, France; Neuroscience Research Institute, State University of New York (C.M.R., G.L.F., G.B.S.), Old Westbury, New York 11568; and the Division of Psychiatry, Harvard Medical School, Brigham and Women's Hospital (G.L.F., G.B.S.), Boston, Massachusetts 02115

## ABSTRACT

The median eminence (ME), which is the common termination field for adenohipophysiotropic systems, has been shown to produce nitric oxide (NO), a signaling molecule involved in neuroendocrine secretion. Using an *ex vivo* technique,  $17\beta$ -estradiol exposure to ME fragments, including vascular tissues, stimulated NO release within seconds in a concentration-dependent manner, whereas  $17\alpha$ -estradiol or testosterone had no effect.  $17\beta$ -Estradiol conjugated to BSA ( $E_2$ -BSA) also stimulated NO release, suggesting mediation by a membrane surface receptor. Tamoxifen, an estrogen receptor inhibitor, antagonized the action of both  $17\beta$ -estradiol and  $E_2$ -BSA. Furthermore, estradiol-stimulated NO stimulates GnRH release. This was demonstrated by hemoglobin (a NO scavenger),  $N^{\omega}$ -nitro-L-arginine methyl

ester, and L- $N^5$ -(1-iminoethyl)ornithine (nitric oxide synthase inhibitors) inhibition of estradiol stimulated NO and GnRH release. In this regard, L- $N^5$ -(1-iminoethyl)ornithine, specific for endothelial constitutive nitric oxide synthase, was significantly more potent, suggesting that the estradiol-stimulated NO release arose from vascular endothelial cells. Additionally, the NO-stimulated GnRH release occurs via guanylyl cyclase activation in GnRH nerve terminals, as ODQ, a potent and selective inhibitor of NO-sensitive guanylyl cyclase, abolished the estradiol-stimulated GnRH release. The results suggest that at physiological concentrations,  $17\beta$ -estradiol may have immediate actions on ME endothelial cells via nongenomic signaling pathways leading to NO-stimulated GnRH release. (*Endocrinology* 140: 652–659, 1999)

GnRH IS synthesized in neuronal cell bodies diffusely distributed in the preoptic area and is secreted from neuroendocrine terminals localized in the median eminence (ME). Once secreted, GnRH enters the portal vessels and is then transported to the anterior pituitary, where it modulates the synthesis and secretion of gonadotropins, which are essential to gonadal function and reproduction. The secretory activity of GnRH neurons is controlled by neural and glial regulatory processes (1–4). Neuronal inputs are mediated via *trans*-synaptic mechanisms, and glial influences are conveyed via substances such as transforming growth factors (5–8). Interestingly, endothelial-ME signaling can occur by nitric oxide (NO) coupling as recently demonstrated (9, 10). In regard to NO, it is a signaling molecule involved in the regulation of numerous neuroendocrine secretions (11) and particularly GnRH release from the neuroendocrine terminals located in the ME external zone (12). NO is also considered to be an important endothelium-derived relaxing factor and may also function to protect blood vessels against

atherosclerotic development by inhibiting monocyte adhesion to the endothelium (for review, see Ref. 13). Concerning estrogen, estradiol can increase endothelial and neuronal nitric oxide synthase (NOS) activities in both males and females (14) and thus endothelial NO production by a cytosolic receptor-mediated system (15).

In this regard, the present study demonstrates that rat ME responds to acute estradiol exposure by releasing NO. We further demonstrate that a consequence of this estrogen-stimulated NO release is the release of GnRH from ME fragments. Taken together, this study represents the first study in which estrogen is demonstrated to exert acute actions that have immediate biological consequences, *i.e.* hormonal release. Furthermore, of equal importance is the demonstration that this signaling process can be initiated and regulated by vascular endothelial cells, demonstrating the presence of neurovascular regulatory processes.

## Materials and Methods

### Animals

Experiments were performed on male rats, which have low estrogen levels but comparable estrogen receptor expression as females (16–21). The Wistar rats (CERJ, St. Berthevin, France), weighing 300–350 g, were housed four per cage and given free access to food and water. All animals were subjected to fixed conditions of lighting (from 0500–1900 h). All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC).

Received May 5, 1998.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Vincent Prevot, INSERM, U-422, Unité de Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale, place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France. E-mail: prevot@biserte.lille.inserm.fr.

\* This work was supported by NIMH Grant COR 17138, NIDA Grant 09010, the Research Foundation and Central Administration of the State University of New York (to G.B.S.), NIH Fogarty Grant INT-00045 (to G.B.S.), the University of Lille II, and the FEDER (LARC network).

## ESTRADIOL COUPLING TO ENDOTHELIAL NO STIMULATES GnRH RELEASE

### Dissection procedure

Animals were killed by decapitation. After rapid removal of the brain, the median eminence and associated vascular tissues were dissected under a binocular magnifying glass by cutting with Wecker's scissors (Moria, France) the floor of the brain within the following limits: posterior border of the optic chiasm and the anterior border of the mamillary bodies. With this type of dissection, pieces containing ME were obtained with very little arcuate nucleus fragments. The total dissection time was less than 3 min from decapitation.

### Incubation system

After dissection, ME fragments were washed twice in Krebs-Ringer bicarbonate/glucose buffer (pH 7.4) containing bacitracin (23  $\mu\text{M}$ ; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in an atmosphere of 95%  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$  and then immersed in Eppendorf tubes containing 700  $\mu\text{l}$  of the same buffer. Three ME fragments were incubated in each tube.

### NO determination

The tissue fragments were incubated as described above. NO release was measured directly using a NO-specific amperometric probe (World Precision Instruments, Sarasota, FL) as described previously (9, 22-24). The tip diameter of the probe (25  $\mu\text{m}$ ) permitted the use of a micromanipulator (Zeiss-Eppendorf, Hamburg, Germany) to position the sensor 5 mm above the tissue surface. Calibration of the electrochemical sensor was performed by use of different concentrations of a nitrosothiol donor *S*-nitroso-*N*-acetyl-D,L-penicillamine, as described in detail previously (25). The probe needed 15 min to stabilize after its immersion in the Krebs-Ringer bicarbonate/glucose buffer medium, and baseline levels of NO release were determined by evaluation of the NO concentration released from unstimulated ME fragments. Drugs were added to the buffer after the stabilization time, and NO release was monitored for 20 min. ME fragments were stimulated with various concentrations of  $17\beta$ -estradiol ( $10^{-13}$ - $10^{-7}$  M) or  $17\beta$ -estradiol conjugated to BSA ( $\text{E}_2$ -BSA;  $10^{-13}$ - $10^{-7}$  M  $17\beta$ -estradiol) or testosterone ( $10^{-13}$ - $10^{-7}$  M; four tubes were run for each condition). ME fragments were stimulated with  $17\alpha$ -estradiol ( $10^{-8}$  M;  $n = 4$ ); tamoxifen ( $10^{-8}$  M), an estrogen receptor antagonist ( $n = 4$ ); tamoxifen ( $10^{-8}$  M) plus  $17\beta$ -estradiol ( $10^{-8}$  M;  $n = 4$ ); or tamoxifen ( $10^{-8}$  M) plus  $\text{E}_2$ -BSA ( $10^{-8}$  M;  $n = 4$ ). Tamoxifen was added to the milieu 5 min before  $17\beta$ -estradiol or  $\text{E}_2$ -BSA. The concentration of NO gas in solution was measured in real-time with computer data acquisition (DUO 18, World Precision Instruments) at a sampling rate of 6/s (22, 23). NO release was evaluated with simultaneous measurement of untreated control ME fragments with a second probe to allow comparison of each treatment group to its own control preparation. Data acquisition was performed by the computer-interfaced DUO-18 software (World Precision Instruments). The experimental values were then transferred to Sigma-Plot and Sigma-Stat (Jandel, San Rafael, CA) for graphic representation and evaluation.

### GnRH secretion determination

The tissue fragments were incubated as described for the NO determination. Drugs were added to the medium after an equilibration period of 15 min. The stimulation period was 10 min. NOS inhibitors, *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME;  $4 \times 10^{-6}$  M) or L-N<sup>5</sup>-(1-iminoethyl)ornithine (L-NIO;  $4 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ , and  $5 \times 10^{-8}$  M), or the potent and selective inhibitor of NO-sensitive guanylyl cyclase, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-one (ODQ;  $2 \times 10^{-6}$  M) (26-29), were added to the milieu 5 min before  $17\beta$ -estradiol or  $\text{E}_2$ -BSA. L-NIO is a well known inhibitor of NOS (30) and shows a better inhibition of endothelial constitutive NOS ( $\text{IC}_{50} = 0.5 \times 10^{-6}$  M) (30) than neuronal NOS (nNOS;  $\text{IC}_{50} = 3.9 \times 10^{-6}$  M) (31). Four tubes were run for each experiment. At the end of each experiment, the ME fragments were immediately removed, and EDTA was added to the milieu (final concentration,  $10^{-2}$  M). GnRH concentrations were measured in duplicate by RIA as described previously (9). The sensitivity for GnRH was 1.2 pg/tube, and the intraassay variability was 3.4%. GnRH antibody was a gift from Dr. Tramu of the CNRS URA 339, Université Bordeaux I (Talence, France). All drugs were purchased from Sigma Chemical Co.

(St. Quentin Fallavier, France), except L-NIO and ODQ, which were purchased from Calbiochem (France Biochem, Meudon, France).

### Plasma estradiol and testosterone determinations

After decapitation, trunk blood was collected into vials containing 50  $\mu\text{l}$  0.3 M EDTA and centrifuged. Plasma was stored at  $-20^\circ\text{C}$  until estradiol and testosterone RIAs.

Plasma estradiol was measured using a RIA kit optimized for the direct quantitative determination of very low concentrations of  $17\beta$ -estradiol in human serum and plasma (e.g. in children), purchased from Sorin Biomedica (Antony, France). The assay sensitivity was 0.2 pg/tube, and intra- and interassay variances were 5.6% and 7.3%, respectively.

Testosterone levels were measured using a RIA kit optimized for the direct quantitative determination of very low concentrations of testosterone in human serum and plasma, purchased from Amersham (Les Ulis, France). The assay sensitivity was 5 pg/tube, and intra- and interassay variances were 5.1% and 11.5%, respectively.

### Statistics

All experiments were repeated a minimum of four times, i.e. at least four tubes were run for each condition. The results were analyzed by one-way ANOVA with repeated measures, and the significance of differences was determined by the Student-Newman-Keuls test. The differences between the means of two groups were calculated by Student's *t* test, where  $P < 0.05$  was considered significantly different.

### Morphology

To assure that tissues were able to maintain a high level of biological organization during the experiments, which may reflect their responses to stimulation, some ME fragments were immersed for 2 h in a fixative mixture of 2% paraformaldehyde, 0.2% picric acid, and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, for 2 h at  $4^\circ\text{C}$  after a 15-min stabilization time plus a 20-min stimulation time. Pieces of tissue were postfixed for 1 h at room temperature with 1%  $\text{OsO}_4$  in phosphate buffer and were embedded in Araldite after dehydration.

Semithin sections (1-2  $\mu\text{m}$  thick) were obtained to observe the tissue conservation at the light microscopy level and ultrathin sections (80-90 nm thick) were obtained to observe the ultrastructural aspect of the ME.

## Results

### Direct evaluation of NO release from ME fragments

NO release was measured in real-time using a NO-specific amperometric probe after stimulation of ME fragments with either  $17\beta$ -estradiol or  $\text{E}_2$ -BSA.

### $17\beta$ -Estradiol stimulates NO release

$17\beta$ -Estradiol induced a concentration-dependent increase in NO release from ME fragments (Figs. 1 and 2). Increasing concentrations of  $17\beta$ -estradiol ( $10^{-11}$ - $10^{-7}$  M) resulted in a dose-dependent increase in NO release, with a maximal effect observed after  $10^{-8}$  M  $17\beta$ -estradiol treatment (Fig. 1). NO release peaked after 2 min of  $17\beta$ -estradiol treatment of the ME fragments (Fig. 2). Addition of  $10^{-12}$  M  $17\beta$ -estradiol failed to induce a significant increase in NO release. The median effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) value for  $17\beta$ -estradiol-induced NO release was approximately  $10^{-10}$  M.

### Testosterone does not stimulate NO release

Increasing concentrations of testosterone ( $10^{-13}$ - $10^{-7}$  M) had no effect on NO release from ME fragments (Fig. 1).

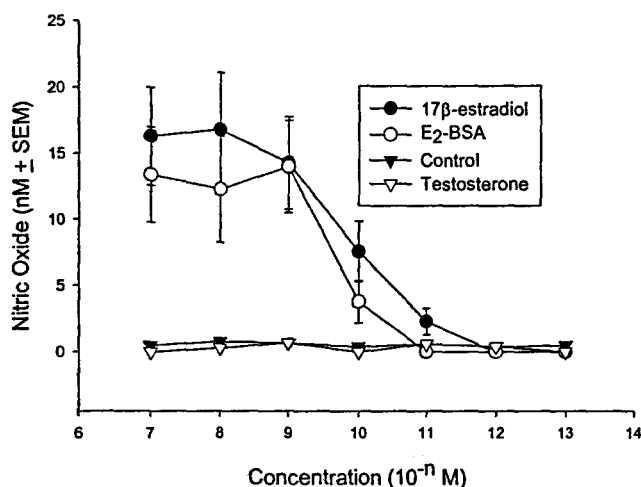


FIG. 1. Dose-dependent release of NO after *in vitro* stimulation of median eminence fragments by 17 $\beta$ -estradiol and E<sub>2</sub>-BSA. Testosterone has no effect on NO release. The graphed values represent peak values obtained 2 min after drug exposure. The ME fragments are exposed to the agents for the entire observation period (15 min; see Fig. 2, *inset*). Each experiment was repeated four times, and the resulting means  $\pm$  SEM are graphed.

### 17 $\beta$ -Estradiol acts at a surface receptor

17 $\beta$ -Estradiol appears to stimulate NO release by acting at the membrane surface, not on an intracellular receptor. E<sub>2</sub>-BSA (10<sup>-8</sup> M), which does not penetrate the cellular membrane due to its size, also stimulates NO release from ME fragments within 2 min of its application in a tamoxifen-sensitive manner (Fig. 2). As for 17 $\beta$ -estradiol, E<sub>2</sub>-BSA-stimulated NO release is dose dependent (Fig. 1). Stimulation of the ME with 10<sup>-11</sup> M E<sub>2</sub>-BSA failed to stimulate a significant increase in NO release. The median effective concentration (EC<sub>50</sub>) for E<sub>2</sub>-BSA-stimulated NO release is approximately 3  $\times$  10<sup>-10</sup> M.

### 17 $\beta$ -Estradiol and 17 $\beta$ -estradiol coupled to BSA stimulate a rapid GnRH secretion from ME nerve terminals

17 $\beta$ -Estradiol (10<sup>-10</sup> and 10<sup>-8</sup> M), like E<sub>2</sub>-BSA (10<sup>-8</sup> M), induced a release of GnRH from ME fragments (Figs. 3 and 4) within 10 min of their application. GnRH levels were significantly increased in the medium after 17 $\beta$ -estradiol or E<sub>2</sub>-BSA addition (Fig. 4; *P* < 0.05) compared with those in the untreated groups. E<sub>2</sub>-BSA was as potent as 17 $\beta$ -estradiol in inducing GnRH release from ME fragments, whereas 17 $\alpha$ -estradiol had no effect on GnRH release (Fig. 4).

### Estradiol-stimulated GnRH release occurs via NO release

E<sub>2</sub>-BSA-stimulated GnRH release was significantly inhibited by hemoglobin (2  $\mu$ g/ml), a NO scavenger, and L-NAME (4  $\times$  10<sup>-6</sup> M), a NOS inhibitor (Fig. 5). The same results were obtained for 17 $\beta$ -estradiol.

### Estradiol-NO-mediated GnRH release occurs via eNOS activation

L-NIO, a more selective inhibitor of eNOS than of nNOS, succeeded in inhibiting E<sub>2</sub>-BSA-stimulated GnRH release

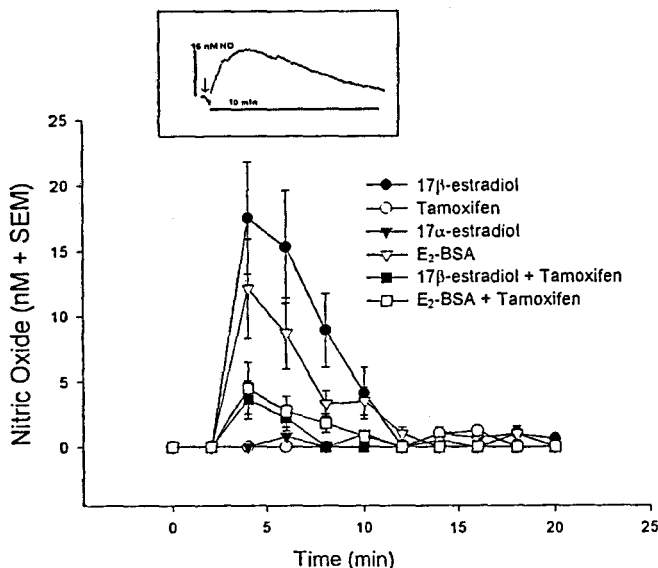


FIG. 2. Steroid-specific stimulation of NO release by 17 $\beta$ -estradiol via a membrane receptor. 17 $\beta$ -Estradiol stimulates NO release from ME fragments within 2 min of its application. 17 $\alpha$ -Estradiol had no effect on NO release (*P* < 0.001). 17 $\beta$ -Estradiol coupled to BSA stimulates NO release at the same time as 17 $\beta$ -estradiol (*P* < 0.01), indicating that estradiol acts at the membrane surface. The 17 $\beta$ -estradiol- and E<sub>2</sub>-BSA-stimulated NO releases were antagonized by tamoxifen, an antiestrogen compound. 17 $\beta$ -Estradiol, E<sub>2</sub>-BSA, and 17 $\alpha$ -estradiol were added to the milieu at 2 min. *Inset*, Representative amperometric NO release after *in vitro* stimulation of NO production by 17 $\beta$ -estradiol (arrow, time of drug application). Each experiment was repeated four times, and the resulting means  $\pm$  SEM are graphed.

### The action of estradiol is steroid specific

17 $\alpha$ -Estradiol (10<sup>-8</sup> M) did not stimulate NO release (Fig. 2). Tamoxifen (10<sup>-8</sup> M), an estradiol receptor inhibitor, significantly diminished (Fig. 2; *P* < 0.01) 17 $\beta$ -estradiol-stimulated NO release.

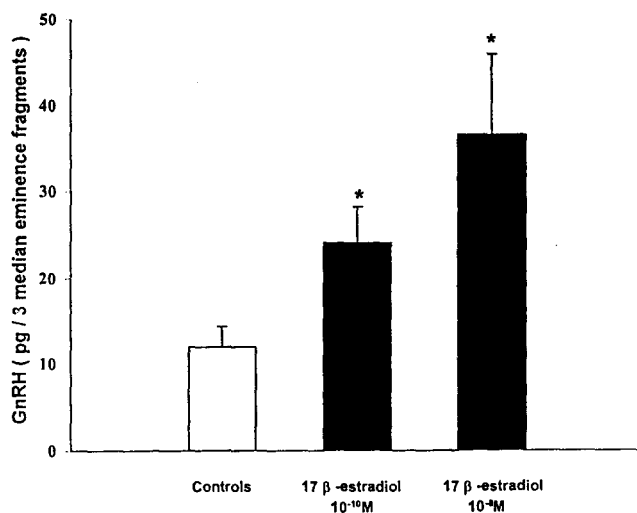


FIG. 3. *In vitro* stimulation of GnRH release from ME fragments by 17 $\beta$ -estradiol (10<sup>-10</sup> and 10<sup>-8</sup> M; black columns). In this figure, the height of the column represents the mean, and the vertical line represents SEM. \*, Significantly different from the white columns, *P* < 0.05. In the following experiments, 17 $\beta$ -estradiol was used at 10<sup>-8</sup> M because this concentration induces maximal NO release (see Fig. 1).

## ESTRADIOL COUPLING TO ENDOTHELIAL NO STIMULATES GnRH RELEASE

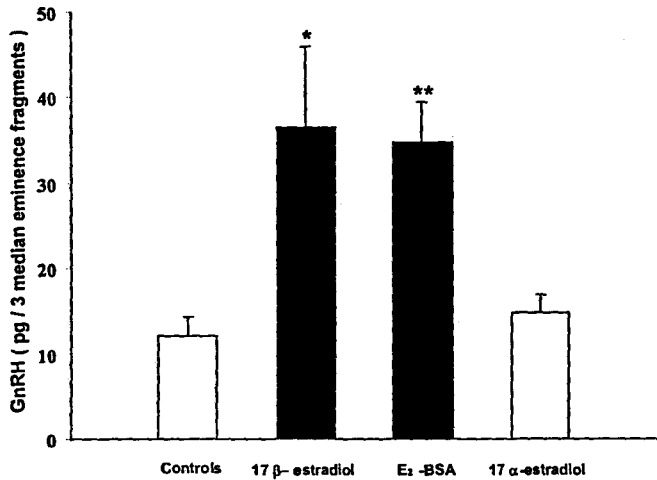


FIG. 4. *In vitro* stimulation of GnRH release from ME fragments by 17β-estradiol ( $10^{-8}$  M) and E<sub>2</sub>-BSA ( $10^{-8}$  M; black columns). Estradiol-stimulated GnRH release is steroid specific, as 17α-estradiol ( $10^{-8}$  M) had no effect (white columns). In this figure, the height of the column represents the mean, and the vertical line represents the SEM. \*, Significantly different from the white columns,  $P < 0.05$ ; \*\*, significantly different from the white columns,  $P < 0.01$ .

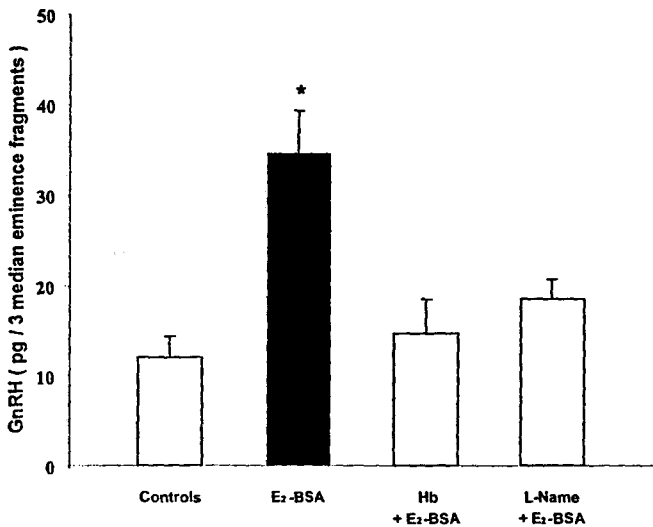


FIG. 5. *In vitro* stimulation of GnRH release from ME fragments by E<sub>2</sub>-BSA ( $10^{-8}$  M; black column) and its inhibition by hemoglobin (Hb; 2 μg/ml) and L-NAME ( $4 \times 10^{-6}$  M; white columns), indicating that the E<sub>2</sub>-BSA-stimulated GnRH release occurs via NO release. In this figure, the height of the column represents the mean, and the vertical line represents the SEM. \*, Significantly different from the white columns,  $P < 0.05$ .

when added at  $5 \times 10^{-7}$  M (Fig. 6). The same results were obtained for 17β-estradiol.

### NO stimulation of GnRH release occurs via guanylyl cyclase activation

The NO-mediated GnRH release after estradiol stimulation (17β-estradiol or E<sub>2</sub>-BSA  $10^{-8}$  M) was inhibited by ODQ ( $2 \times 10^{-6}$  M), an inhibitor of NO-sensitive guanylyl cyclase (Fig. 7).

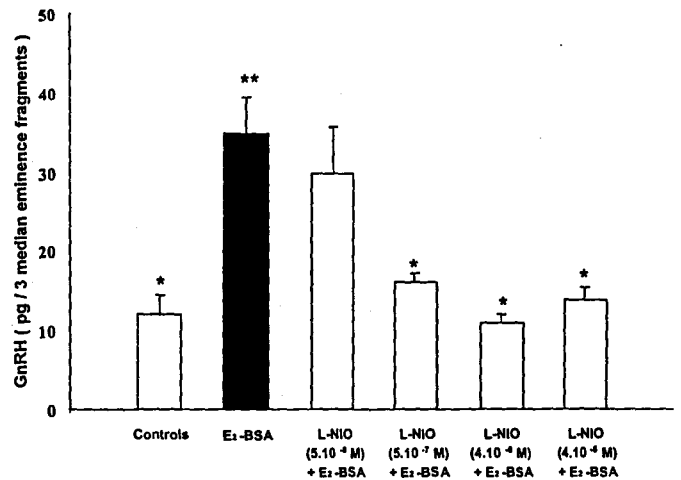


FIG. 6. *In vitro* stimulation of GnRH release from ME fragments by E<sub>2</sub>-BSA ( $10^{-8}$  M; black column) and its inhibition by L-NIO. The inhibition of the E<sub>2</sub>-BSA-stimulated GnRH release initiated by L-NIO is significant at  $5 \times 10^{-7}$  M, indicating that the major source of NO might be endothelial in origin (see Discussion). L-NIO is unable to significantly inhibit E<sub>2</sub>-BSA-stimulated GnRH release when applied at  $5 \times 10^{-8}$  M. In this figure, the height of the column represents the mean, and the vertical line represents the SEM. \*\*, Significantly different from the columns with \*,  $P < 0.05$ .

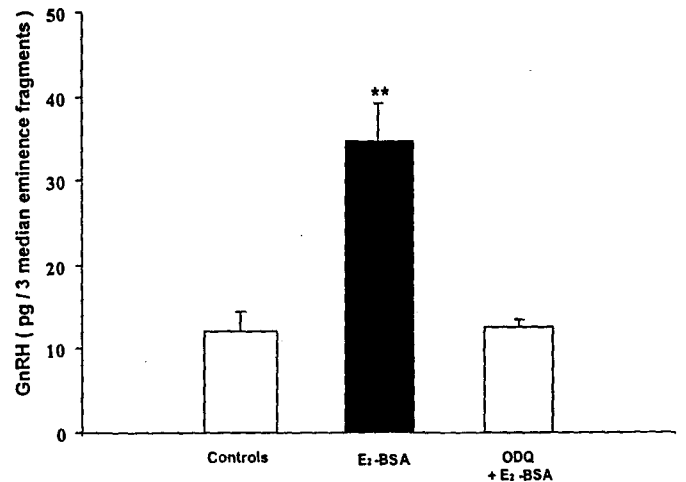


FIG. 7. *In vitro* stimulation of GnRH release from ME fragments by E<sub>2</sub>-BSA ( $10^{-8}$  M; black column) and its inhibition by ODQ ( $2 \times 10^{-6}$  M), indicating that the NO-mediated GnRH release occurs via the stimulation of the soluble guanylyl cyclase in GnRH nerve terminals. In this figure, the height of the column represents the mean, and the vertical line represents the SEM. \*\*, Significantly different from the white columns,  $P < 0.01$ .

### Testosterone and estradiol plasmatic levels at the time of death

The average testosterone level was  $5.63 \pm 0.45$  nM ( $n = 6$ ), and the average estradiol level was  $0.12 \pm 0.01$  nM ( $n = 6$ ). These results are in accordance with those of Chowen *et al.* (32).

### Tissue preservation

Structural examination of the ME fragments with light (Fig. 8A) and electronic (Fig. 8B) microscopies demonstrated

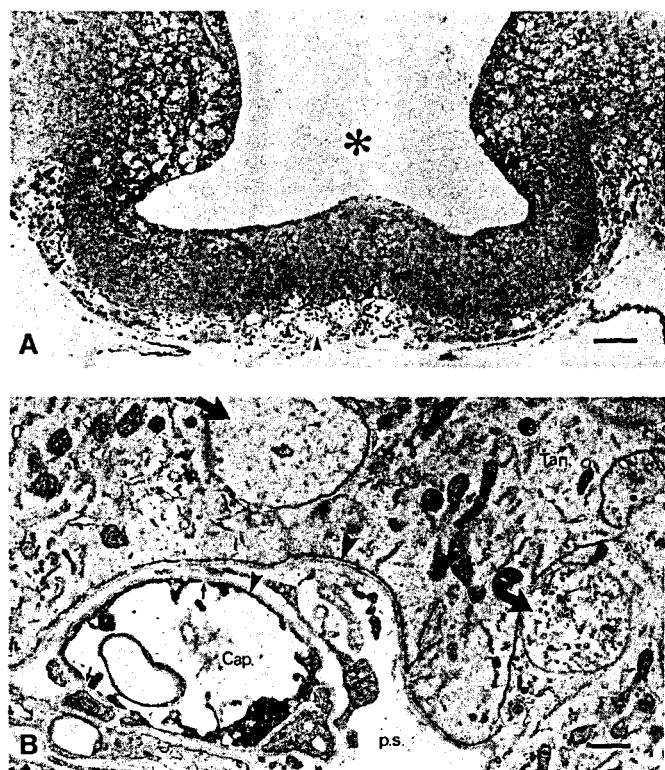


FIG. 8. Light microphotograph obtained from coronal section of ME fragments (A). Electron microphotograph of ultrathin section showing the ME external zone (B). The observation of the structure (A) and the ultrastructure (B) of the treated ME fragments demonstrates that the conservation of the tissues was excellent after the 35-min incubation in the survival milieu. A: Asterisk, Third ventricle; arrowhead, capillaries. Scale bar, 760  $\mu\text{m}$ . B: Big arrow, Nerve terminal; big arrowhead, parenchymatous basal lamina; little arrowhead, endothelial basal lamina; little arrow, fenestrated endothelium. Cap., Capillary; p.s., pericapillary space; Tan., tanyocytes. Scale bar, 0.65  $\mu\text{m}$ .

that the tissues were in an excellent state of preservation after a 35-min incubation period. The parenchyme of the ME external zone was well preserved (Fig. 8), the nerve endings were in close contact with ependymal processes that reached the portal capillary bed. Inside the nerve endings and tanyctic end feet, the different organelles were also well preserved. The parenchymatous and endothelial basement membranes were well visible (Fig. 8b). Together, these observations proved that even after a 35-min incubation period, the ME structure was comparable to that observed upon placing the tissues immediately, without delay, in the fixative solution (33), and was compatible with the occurrence of physiological processes throughout the experiment.

### Discussion

The present study demonstrates that at physiological concentrations,  $17\beta$ -estradiol rapidly stimulates NO release from ME fragments, and this, in turn, stimulates GnRH release. This process appears to be mediated by a specific estradiol receptor, as noted by its antagonism by tamoxifen and the lack of  $17\alpha$ -estradiol and testosterone action. The fact that  $E_2$ -BSA, an impermeable cell membrane estradiol analog, also stimulates NO release indicates that this receptor is located on the surface of the NOS-containing cells. Further-

more,  $17\beta$ -estradiol- and  $E_2$ -BSA-stimulated GnRH release is inhibited by hemoglobin (a NO scavenger), and by L-NAME and L-NIO, NOS inhibitors, indicating that the effects of estradiol on GnRH secretion are mediated by coupling to NO. Moreover, according to Rees *et al.* (30) and Moore *et al.* (31), L-NIO is much more potent in inhibiting eNOS than nNOS at the concentrations used in this study, suggesting that the major source of NO after  $E_2$ -BSA or  $17\beta$ -estradiol stimulation is endothelial in origin. Furthermore, the NO stimulation of GnRH release occurs via the soluble guanylyl cyclase activation in the GnRH nerve terminals, as estradiol-stimulated GnRH release was inhibited by ODO, a NO-sensitive guanylyl cyclase inhibitor (26–29). Taken together, the rapid action of estradiol on GnRH release from ME fragments appears to be mediated by a NOS-coupled estrogen receptor located on the surface of endothelial cells found in the ME fragments.

NO release has been shown to be crucial for the occurrence of basal LH release in males (12) and the LH surge in ovariectomized females treated with estradiol plus progesterone (34, 35). Further, NO donors have been shown to be able to induce LH surge in estradiol-treated ovariectomized females (36) and thus to have a progesterone-like effect. Very recent findings show that estradiol stimulates nNOS expression in the preoptic area and in that way exerts a facilitatory influence on NO-producing neurons (29). The NO released appears to be able to modulate the activity of GnRH neurons (29). These observations implicate neuronal NO in the regulation of GnRH cell activity in the preoptic area. Contrary to these results, the present study, in accordance with our previous work (9), suggests that at the ME level, the NO implicated in the modulation of GnRH release is endothelial in origin rather than neuronal. This is consistent with the fact that unlike in the preoptic area where GnRH perikarya are surrounded by nNOS-containing cells, nNOS fibers and GnRH fibers in the ME are distributed separately in the internal and external zones, respectively (37). Further, in the ME, eNOS immunoreactivity is observed in endothelial cells of the pituitary portal blood vessels (38), located at the immediate proximity of the GnRH terminals (33). The endothelial origin of NO secreted from ME fragments is strengthened by the results of a previous study which showed that central administration of eNOS antisense is more efficacious than nNOS antisense administration in suppressing the estradiol-/progesterone-induced LH surge in ovariectomized females (10).

Regarding estradiol, it has been implicated in vascular reactivity (for review, see Refs. 39 and 40) and more particularly in the stimulation of NO synthesis (40, 41). The long term stimulatory effects of estradiol on NO activity may also take place by increasing eNOS synthase production (14, 42, 43). Estradiol can increase eNOS expression within 8 h after its application on human vein endothelial cells via a cytosolic receptor-mediated system, and this action can be inhibited by the estrogen receptor antagonist, tamoxifen (15). The presence of two left-half palindromic sites of an estrogen receptor-binding element on the human eNOS gene supports a potential receptor-mediated effect of estrogen on gene expression (44). Our study clearly shows that beside its long term action via a nuclear receptor on NO release from en-

dothelia (15, 44), estradiol can have a short term stimulating action, *i.e.* NO release, via a specific membrane estrogen receptor on ME fragments. Tamoxifen is considered to be an antagonist at the nuclear estrogen receptor, but our results, in accordance with those of others (45, 46), suggest that tamoxifen antagonizes the effect of estradiol on its membrane receptor. In this way, tamoxifen has been shown to block the internalization of the nonactivated membrane estrogen receptor in the goat uterus (47).

This acute effect of estrogen on GnRH release from mediobasal hypothalamus has been poorly investigated compared with processes involving progesterone (48). Only one study showed that  $17\beta$ -estradiol had a receptor-mediated effect on GnRH release within 30 min in response to depolarization evoked by elevating  $K^+$  concentration (46). These researchers concluded that a membrane effect of  $17\beta$ -estradiol is present (46). In the present study we substantiate this observation and provide a mechanism, *i.e.* via NO, for the acute stimulatory effect of  $17\beta$ -estradiol on GnRH release. We surmise that estradiol-stimulated NO causes activation of the soluble guanylyl cyclase in GnRH terminals and results in cGMP production and, thus, in a depolarization involving a cationic conductance (49) that leads to GnRH release (46). Our findings are in accordance with recent evidence showing that NO stimulates GnRH release by an intracellular signal transduction process involving cGMP (34, 50, 51). As suggested by others, NO may also activate cyclooxygenase in GnRH terminals and/or glia that results in the production of  $PGE_2$  (52).  $PGE_2$  would then lead to the mobilization of calcium from intracellular stores (53) and cAMP formation (54), which finally induces the exocytosis of GnRH secretory granules (52). In this regard, a recent study showed  $PGE_2$  receptor gene expression in GnRH neurons (55).

In the male rat, estrogen plasma levels, as shown by our results, are comparable to those found in early proestrus female rats (33). Part of this plasma estradiol appear to arise from testosterone aromatization (32). In the present study we show that testosterone, in contrast to estradiol, is unable to stimulate NO release from male rat ME fragments. Our results suggest that on ME fragments, testosterone does not act on membrane receptors coupled to NOS activity and is not metabolized into estradiol. The latest observation is consistent with the fact that aromatase is not expressed in the ME (56). In male rats the effect of estrogen on GnRH release has not been investigated. One study on the adult male quail showed that basal GnRH release was increased by short term exposure of hypothalamic slices to  $17\beta$ -estradiol, whereas testosterone had no effect (57). In female rats estrogen has both stimulatory and inhibitory effects on GnRH release depending on their plasma levels (for review, see Refs. 58 and 59). Kalra and Kalra (60) and Smith *et al.* (61) have shown that on diestrus day 1 and proestrus, GnRH output increases markedly, coincident with the rise in serum  $17\beta$ -estradiol. Moreover, we have shown in a previous work (33) that the peak level of estradiol obtained at 0900 h on proestrus was associated with GnRH release between 0900–1000 h on proestrus. In this same study (33) a new peak of estradiol appeared at 1700 h on proestrus, which might be associated

with the GnRH surge that might occur at the same time, as shown by Sarkar and Minami (62).

The local and acute effect of estradiol on ME endothelium might have physiological implications, the major being the modulation of pulsatile GnRH secretion (63, 64) leading to LH release. It could also be implied in circumstances where a role for estrogen has been demonstrated, such as in mood disturbance (65, 66), mental stress (67), and premenstrual syndrome (65). In addition, extrapolation from the present neuroendocrinological model appears to identify the existence of another important mode of communication between the brain and the blood. Indeed, as shown by the present study and supported by our previous work (9), various signaling molecules, such as estradiol, morphine, and anandamide, conveyed in the blood can communicate with the brain without penetrating it, via NO production originating from the endothelium. We surmise that in other brain areas, molecules that cannot penetrate the blood-brain barrier could also modulate neuronal activity via endothelial NO signaling.

In summary, these observations are in direct line with our previous study demonstrating that rat ME produces NO in response to stimulatory molecules acting on ME endothelial cells (9). In the present study,  $17\beta$ -estradiol coupling to endothelial NO stimulates GnRH release from ME fragments via a membrane receptor. These effects occur at physiological concentrations and may play an important role in the modulation of pulsatile GnRH secretion from GnRH neuroendocrine terminals of the ME and thus represent a synchronizing link to anatomically scattered GnRH neurons (63, 64, 68). Additionally, this work demonstrates that the vascular endothelium in the ME is involved in the modulation of neurosecretions.

#### Acknowledgments

The authors thank Dr. L. Buée for support and advice, and Mrs. G. Mortreux for excellent technical assistance with the RIAs.

#### References

- Ramirez VD, Feder HH, Sawyer CH 1984 The role of brain catecholamines in the regulation of LH secretion: a critical inquiry. In: Martini L, Ganong WF (eds) *Frontiers in Neuroendocrinology*. Raven Press, New York, vol 8:27–84
- Kalra SP 1986 Neural circuitry involved in the control of LHRH secretion: a model for preovulatory LH release. In: Martini L, Ganong WF, (eds) *Frontiers in Neuroendocrinology*. Raven Press, New York, vol 9:31–75
- Ojeda SR 1994 The neurobiology of mammalian puberty: has the contribution of glial cells been underestimated? *J NIH Res* 6:51–56
- Terasawa E 1995 Mechanisms controlling the onset of puberty in primates: the role of GABAergic neurons. In: Plant TM, Lee PA (eds) *The Neurobiology of Puberty*. Journal of Endocrinology, Bristol, pp 139–151
- Ojeda SR, Urbanski HF, Costa ME, Hill DF, Moholt-Siebert M 1990 Involvement of transforming growth factor  $\alpha$  in the release of luteinizing hormone-releasing hormone from the developing female hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9698–9702
- Melcangi RC, Galbiati M, Messi E, Magnaghi V, Cavarretta I, Riva MA, Zanisi M 1997 Astrocyte-neuron interactions in vitro: role of growth factors and steroids on LHRH dynamics. *Brain Res Bull* 44:465–469
- Melcangi RC, Galbiati M, Messi E, Piva F, Martini L, Motta M 1995 Type 1 astrocytes influence luteinizing hormone-releasing hormone release from the hypothalamic cell line GT1-1: is transforming growth factor- $\beta$  the principle involved? *Endocrinology* 136:679–686
- Ma YJ, Berg-von der Emde K, Rage F, Wetsel WC, Ojeda SR 1997 Hypothalamic astrocytes respond to transforming growth factor- $\alpha$  with the secretion of neuroactive substances that stimulate the release of luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 138:19–25
- Prevot V, Rialas CM, Croix D, Salzet M, Dupouy JP, Poulain P, Beauvillain JC, Stefano GB 1998 Morphine and anandamide coupling to nitric oxide



- stimulates GnRH and CRF release from rat median eminence: neurovascular regulation. *Brain Res* 790:236-244
10. Aguan K, Malesh VB, Ping L, Bhat G, Brann DW 1996 Evidence for physiological role for nitric oxide in the regulation of the LH surge: effect of central administration of antisense oligonucleotides to nitric oxide synthase. *Neuroendocrinology* 64:449-455
  11. Brann W, Bhat GK, Lamar CA, Malesh VB 1997 Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 65:385-395
  12. Rettori V, Belova N, Dees WL, Nyberg CL, Gimeno M, McCann SM 1993 Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release *in vivo* and *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10130-10134
  13. Fricchione GL, Bilfinger TV, Hartman A, Liu Y, Stefano GB 1996 Neuro-immunologic implications in coronary artery disease. *Adv Neuroimmunol* 6:131-142
  14. Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S 1994 Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5212-5216
  15. Hayashi T, Yamada K, Esaki T, Kuzuya M, Satake S, Ishikawa T, Hidaka H, Iguchi A 1995 Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. *Biochem Biophys Res Commun* 214:847-855
  16. Brown TJ, Clark AS, MacLusky NJ 1987 Regional sex differences in progesterin receptor induction in the rat hypothalamus: effects of various doses of estradiol benzoate. *J Neurosci* 7:2529-2536
  17. Brown TJ, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F 1990 Comparison of age- and sex-related changes in cell nuclear estrogen-binding capacity and progesterin receptor induction in the rat brain. *Endocrinology* 126:2965-2972
  18. Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW 1990 Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an *in situ* hybridization study. *J Comp Neurol* 294:76-95
  19. Shughrue PJ, Bushnell CD, Dorsa DM 1992 Estrogen receptor messenger ribonucleic acid in female rat brain during the estrous cycle: a comparison with ovariectomized females and intact males. *Endocrinology* 131:381-388
  20. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS 1997 Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER $\alpha$ -knockout mouse. *Endocrinology* 138:4613-4621
  21. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA 1997 Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* 138:863-870
  22. Magazine I 1995 Detection of endothelial cell-derived nitric oxide: current trends and future directions. *Adv Neuroimmunol* 5:479-490
  23. Stefano GB, Hartman A, Bilfinger TV, Magazine HI, Liu Y, Casares F, Goligorsky MS 1995 Presence of the  $\mu_3$  opiate receptor in endothelial cells. *J Biol Chem* 270:30290-30293
  24. Tsukahara H, Gordienko DV, Goligorsky MS 1993 Continuous monitoring of nitric oxide release from human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 193:722-729
  25. Stefano GB, Christensen VB, Tonnesen E, Liu Y, Hughes TK, Bilfinger TV 1996 Interleukin 10 stimulation of endogenous nitric oxide release from human saphenous veins diminishes immunocyte adherence. *J Cardiovasc Pharmacol* 30:90-95
  26. Southam E, Charles SL, Garthwaite J 1996 The nitric oxide-cyclic GMP pathway and synaptic plasticity in the rat superior cervical ganglion. *Br J Pharmacol* 119:527-532
  27. Brunner F, Stessel H, Kukovetz WR 1995 Novel guanylyl cyclase inhibitor, ODQ reveals role of nitric oxide, but not of cyclic GMP in endothelin-1 secretion. *FEBS Lett* 376:262-266
  28. Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B 1995 Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* 48:184-188
  29. Fu S, Kalra PS, Kalra SP 1998 Ovarian steroid-independent diurnal rhythm in cyclic GMP/nitric oxide efflux in the medial preoptic area: possible role in preovulatory and ovarian steroid-induced LH surge. *J Neuroendocrinol* 10:617-625
  30. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S 1990 Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol* 101:746-752
  31. Moore WM, Webber RK, Jerome GM, Tjoeng FS, Misk TP, Currie MG 1994 L-N<sup>G</sup>-(1-Iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem* 37:3886-3888
  32. Chowen JA, Argente J, Vician L, Clifton DK, Steiner RA 1990 Pro-opiomelanocortin messenger RNA in hypothalamic neurons is increased by testosterone through aromatization to estradiol. *Neuroendocrinology* 52:581-588
  33. Prevot V, Dutoit S, Croix D, Tramu G, Beauvillain JC 1998 Semi-quantitative ultrastructural analysis of the localization and neuropeptide content of gonadotropin releasing hormone nerve terminals in the median eminence throughout the estrous cycle of the rat. *Neuroscience* 84:177-191
  34. Bonavera JJ, Sahu A, Kalra PS, Kalra SP 1993 Evidence that nitric oxide may mediate the ovarian steroid-induced luteinizing hormone surge: involvement of excitatory amino acids. *Endocrinology* 133:2481-2487
  35. Bonavera JJ, Sahu A, Kalra PS, Kalra SP 1994 Evidence in support of nitric oxide (NO) involvement in the cyclic release of prolactin and LH surges. *Brain Res* 660:175-179
  36. Bonavera JJ, Kalra PS, Kalra SP 1996 L-Arginine/nitric oxide amplifies the magnitude and duration of the luteinizing hormone surge induced by estrogen: involvement of neuropeptide Y. *Endocrinology* 137:1956-1962
  37. Herbison AE, Simonian SX, Norris PJ, Emson PC 1996 Relationship of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat. *J Neuroendocrinol* 8:73-82
  38. Yamada K, Emson P, Hokfelt T 1996 Immunohistochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat hypothalamus and colocalization with neuropeptides. *J Chem Neuroanat* 10:295-316
  39. White MM, Zamudio S, Stevens T, Tyler R, Lindenfeld J, Leslie K, Moore LG 1995 Estrogen, progesterone, and vascular reactivity: potential cellular mechanisms. *Endocr Rev* 16:739-751
  40. Wellman GC, Bonev AD, Nelson MT, Brayden JE 1996 Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels. *Circ Res* 79:1024-1030
  41. Van Buren GA, Yang DS, Clark KE 1992 Estrogen-induced uterine vasodilation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Am J Obstet Gynecol* 167:828-833
  42. Goetz RM, Morano I, Calovini T, Studer R, Holtz J 1994 Increased expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat aorta during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun* 205:905-910
  43. Hishikawa K, Nakaki T, Marumo S, Suzuki H, Kato R, Saruta T 1995 Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett* 360:291-293
  44. Miyahara K, Kawamoto T, Sase K, Yui Y, Toda K, Yang LX, Hattori R, Aoyama T, Yamamoto Y, Doi Y 1994 Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene. *Eur J Biochem* 223:719-726
  45. Wong M, Moss RL 1991 Electrophysiological evidence for a rapid membrane action of the gonadal steroid, 17 $\beta$ -estradiol, on CA1 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *Brain Res* 573:148-152
  46. Drouva SV, Laplante E, Gautron JP, Kordon C 1984 Effects of 17 $\beta$ -estradiol on LH-RH release from rat mediobasal hypothalamic slices. *Neuroendocrinology* 38:152-157
  47. Karthikeyan N, Thampan RV 1996 Plasma membrane is the primary site of localization of the nonactivated estrogen receptor in the goat uterus: hormone binding causes receptor internalization. *Arch Biochem Biophys* 325:47-57
  48. Ramirez VD, Zheng J 1996 Membrane sex-steroid receptors in the brain. *Front Neuroendocrinol* 17:402-439
  49. Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL 1985 Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 313:310-313
  50. Pu S, Xu B, Kalra SP, Kalra PS 1996 Evidence that gonadal steroids modulate nitric oxide efflux in the medial preoptic area: effects of N-methyl-D-aspartate and correlation with luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 137:1949-1955
  51. Moretto M, Lopez FJ, Negro-Vilar A 1993 Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 133:2399-2402
  52. Rettori V, Gimeno M, Lyson K, McCann SM 1992 Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E<sub>2</sub> release from the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11543-11546
  53. Ojeda SR, Negro-Vilar A 1985 Prostaglandin E<sub>2</sub>-induced luteinizing hormone-releasing hormone release involves mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Endocrinology* 116:1763-1770
  54. Ojeda SR, Urbanski HF, Katz KH, Costa ME 1985 Stimulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production enhances hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release without increasing prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis: studies in prepubertal female rats. *Endocrinology* 117:1175-1178
  55. Rage F, Lee BJ, Ma YJ, Ojeda SR 1997 Estradiol enhances prostaglandin E<sub>2</sub> receptor gene expression in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons and facilitates the LHRH response to PGE<sub>2</sub> by activating a glia-to-neuron signaling pathway. *J Neurosci* 17:9145-9156
  56. Sanghera MK, Simpson ER, McPhaul MJ, Kozlowski G, Conley AJ, Lephart ED 1991 Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology* 129:2834-2844
  57. Li Q, Tamarkin L, Levantine P, Ottinger MA 1994 Estradiol and androgen modulate chicken luteinizing hormone-releasing hormone-I release *in vitro*. *Biol Reprod* 51:896-903
  58. Kalra SP, Kalra PS 1989 Do testosterone and estradiol-17 $\beta$  enforce inhibition or stimulation of luteinizing hormone-releasing hormone secretion? *Biol Reprod* 41:559-570
  59. Herbison AE 1998 Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19:302-330
  60. Kalra SP, Kalra PS 1974 Temporal interrelationships among circulating levels of estradiol, progesterone and LH during the rat estrous cycle: effects of exogenous progesterone. *Endocrinology* 95:1711-1718
  61. Smith MS, Freeman ME, Neill JD 1975 The control of progesterone secretion

## ESTRADIOL COUPLING TO ENDOTHELIAL NO STIMULATES GnRH RELEASE

- during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96:219-226
62. Sarkar DK, Minami S 1995 Diurnal variation in luteinizing hormone-releasing hormone and  $\beta$ -endorphin release in pituitary portal plasma during the rat estrous cycle. *Biol Reprod* 53:38-45
63. Purnelle G, Gerard A, Czajkowski V, Bourguignon JP 1997 Pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone by rat hypothalamic explants of GnRH neurons without cell bodies. *Neuroendocrinology* 66:305-312
64. Lopez FJ, Moretto M, Merchenthaler I, Negro-Vilar A 1997 Nitric oxide is involved in the genesis of pulsatile LHRH secretion from immortalized LHRH neurons. *J Neuroendocrinol* 9:647-654
65. Schmidt PJ, Nieman LK, Danaceau MA, Adams LF, Rubinow DR 1998 Differential behavioral effects of gonadal steroids in women with and in those without premenstrual syndrome. *N Engl J Med* 338:209-216
66. Elmquist JK, Scammell TE, Saper CB 1997 Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. *Trends Neurosci* 20:565-570
67. Del Rio G, Velardo A, Menozzi R, Zizzo G, Tavernari V, Grazia Venneri M, Marrama P, Petraglia F 1998 Acute estradiol and progesterone administration reduced cardiovascular and catecholamine responses to mental stress in menopausal women. *Neuroendocrinology* 67:269-274
68. Lopez FJ, Merchenthaler I, Moretto M, Negro-Vilar A 1998 Modulating mechanisms of neuroendocrine cell activity: the LHRH pulse generator. *Cell Mol Neurobiol* 18:125-146

---

### Bone and Tooth Society Meeting 22-24 June 1999, Bristol, UK

Organisers: Jon Beresford (Bath) and Jon Tobias (Bristol). Abstract deadline: 1 March 1999. Further details from Janet Crompton, 29 North Road, St. Andrews, Bristol BS6 5AD, UK. Tel: +44 (0)117 924 8160; Fax: +44 (0)117 924 1208; E-mail: janetcrompton@compuserve.com.



Les résultats de notre étude montrent que des doses physiologiques de  $17\beta$ -œstradiol stimulent une sécrétion rapide de NO par les fragments d'EM.

La  $17\beta$ -œstradiol semble agir spécifiquement sur un récepteur aux stéroïdes gonadiques, du fait que son action est antagonisée par le tamoxifen, un antagoniste spécifique des récepteurs aux œstrogènes. Cette stimulation de la sécrétion de NO est de plus spécifique de l'œstradiol, étant donné que la  $17\alpha$ -œstradiol, stéréoisomère de la  $17\beta$ -œstradiol, et la testostérone n'ont aucun effet.

Par ailleurs, la stimulation de la libération de NO par la  $17\beta$ -œstradiol couplée à la sérum albumine bovine ( $E_2$ -BSA), qui ne peut pénétrer la membrane plasmique, montre que la  $17\beta$ -œstradiol agit sur un récepteur membranaire.

Enfin, la  $17\beta$ -œstradiol et la  $17\beta$ -œstradiol-BSA stimulent une libération rapide de GnRH. Cet effet est inhibé par l'hémoglobine, un chélateur de NO, et par des inhibiteurs de la NOS, le L-NAME et le L-NIO, montrant que la libération de GnRH induite par la  $17\beta$ -œstradiol passe via la stimulation de la sécrétion de NO.

De plus, le NO sécrété suite à une stimulation de  $17\beta$ -œstradiol apparaît être d'origine endothéliale : en effet aux concentrations utilisées, le L-NIO inhibe préférentiellement la ecNOS, et n'inhibe que très partiellement la nNOS (Rees *et al.*, 1990 ; Moore *et al.*, 1994).

Le NO sécrété par la ecNOS semble avoir pour cible directe la guanylyl cyclase des terminaisons à GnRH, car la libération de GnRH induite par le NO est inhibée par l'ODQ, inhibiteur de la guanylyl cyclase soluble.

En résumé, la sécrétion rapide de GnRH induite par la  $17\beta$ -œstradiol passerait par l'activation d'un récepteur aux œstrogènes, couplé à une ecNOS, et localisé sur la membrane plasmique des cellules endothéliales des capillaires du plexus porte hypophysaire des fragments d'éminence médiane.

# **DISCUSSION**

# Discussion

## I. Sécrétion de GnRH et Plasticité

### I.A. La sécrétion de GnRH est au cours du cycle œstral, sous la dépendance d'une plasticité morphologique de la zone externe de l'éminence médiane

Les résultats de notre première étude montrent chez la rate l'existence de contacts entre les terminaisons à GnRH de la zone externe de l'éminence médiane et la lame basale parenchymateuse, et révèlent ainsi chez la femelle que la GnRH est capable de passer directement des terminaisons nerveuses à GnRH à la lumière des capillaires du plexus porte. De manière frappante, ces contacts ne sont visualisés que le jour du proœstrus, et non aux autres stades du cycle œstral. Néanmoins, ces contacts demeurent rares et leur nombre reste inquantifiable d'un point de vue statistique. Le fait que des contacts ne sont pas visualisés les jours du diœstrus II et de l'œstrus, ne semble pas être dû à une limite technique telle que le passage d'un certain nombre de terminaisons à GnRH en dessous du seuil d'immunodélectabilité. En effet, le nombre de terminaisons à GnRH et leur contenu en décapeptide sont, à ces moments du cycle œstral, comparables à ceux obtenus chez des animaux sacrifiés à 10 et 13 heures le jour du proœstrus, pour lesquelles des contacts entre les terminaisons à GnRH et l'espace péricapillaire ont été observés. Ainsi à ces stades du cycle œstral, l'absence de contact pourrait plutôt être liée à la faible activité sécrétoire du système GnRH (Levine et Ramirez, 1982 ; Park et Ramirez, 1989 ; Sarkar et Minami, 1995).

La quantification de la distance moyenne des terminaisons à GnRH à la lame basale montre que ce paramètre ne varie pas au cours du cycle œstral, contrairement à ce qui a été montré après gonadectomie (King et Letourneau, 1994). Ceci indique que les phénomènes de plasticité qui se dérouleraient dans la zone externe de l'éminence médiane au cours du cycle œstral pour réguler l'accès des terminaisons à GnRH à l'espace péricapillaire, ne

résulteraient pas d'importants remaniements morphologiques s'opérant sur la journée du proœstrus comme l'avait prédit Koslowsky et Coates (1985), mais plutôt de changements morphologiques ténus, difficiles à saisir à l'échelle de l'heure.

Les résultats obtenus lors de cette première étude permettent d'envisager l'existence d'une plasticité morphologique régulant l'accès des terminaisons à GnRH à l'espace péricapillaire au cours du cycle œstral. Cependant le caractère rare et inquantifiable des contacts observés le jour du proœstrus, nous a conduit lors d'un deuxième travail à suivre individuellement, sur coupes sériées, l'évolution de chaque terminaison à GnRH localisée à moins de 5  $\mu$ m de l'espace péricapillaire. Ceci, dans le but de connaître le devenir des terminaisons à GnRH les plus proches de la lame basale parenchymateuse, et d'essayer de saisir les moindres remaniements morphologiques de la zone externe de l'éminence médiane qui pourraient permettre à ces terminaisons nerveuses de rentrer en contact avec l'espace péricapillaire. Cette approche a permis de montrer que le jour du proœstrus, 12,6 % des terminaisons à GnRH situées à proximité de la lame basale contactaient cette dernière. Par contre, le jour du diœstrus II aucune terminaison à GnRH n'a pu être visualisée au contact de l'espace péricapillaire. Ces résultats nous permettent donc de conclure définitivement qu'il existe des remaniements morphologiques dans la zone externe de l'éminence médiane entre le jour du diœstrus et le jour du proœstrus. De tels remaniements apparaîtraient empêcher l'accès des terminaisons à GnRH à l'espace péricapillaire le jour du diœstrus II, moment du cycle œstral où l'activité du système à GnRH est faible, alors qu'ils sembleraient favoriser cet accès le jour du proœstrus, moment du cycle œstral où l'activité du système à GnRH est optimale. En faveur de cette hypothèse, les résultats de la quantification du pourcentage d'évagination de la lame basale parenchymateuse montre que cette dernière présente deux fois plus de villosités le jour du proœstrus que le jour du diœstrus. L'augmentation du pourcentage d'évagination de la lame basale parenchymateuse le jour du proœstrus se traduit par une augmentation de la surface d'apposition entre la zone externe de l'éminence médiane et l'espace péricapillaire et pourrait ainsi contribuer à augmenter la probabilité pour les terminaisons à GnRH de contacter cette lame basale. Cette hypothèse semble être renforcée par le fait que le jour du proœstrus, la majorité des contacts observés grâce au suivi sur coupes sériées des terminaisons à GnRH s'effectuent avec des évaginations de la lame basale. Le fait que la lame basale parenchymateuse présente deux fois plus de villosités le

jour du proestrus que le jour du diestrus II suppose une synthèse *de novo* de lame basale entre ces deux stades du cycle œstral et un remaniement du cytosquelette des tanocytes qui sont ancrés dans la lame basale parenchymateuse par des hémi-desmosomes. De tels remaniements supposent une interaction dynamique entre les différents éléments cellulaires constituant la zone externe de l'éminence médiane, c'est à dire entre les tanocytes, les terminaisons à GnRH et les cellules endothéliales des capillaires porte.

Les nombreux contacts entre les terminaisons à GnRH et l'espace péricapillaire observés par évagination de la lame basale suggèrent que la majorité des contacts entre les terminaisons à GnRH et l'espace péricapillaire pourrait être de ce type et que le passage de la GnRH pourrait s'effectuer essentiellement via des passages étroits. Cependant, le fait d'observer quelques contacts plus larges peut aussi indiquer que ces images correspondent au début ou à la fin d'un phénomène de plasticité conduisant à l'établissement de contacts plus massifs. Si cette dernière hypothèse se vérifiait, il faudrait admettre que les larges contacts s'effectuent pendant des temps très courts car l'observation sur coupes sériées augmente considérablement le nombre de contacts étroits observés mais pas celui des contacts réalisés sur une grande surface de la membrane axoplasmique. Ainsi, l'établissement des contacts neurovasculaires pour les terminaisons à GnRH le jour du proestrus pourraient être sous le contrôle d'une plasticité neuro-glio-vasculaire rapide.

Etant donné que le phénomène majeur qui se déroule entre le soir du diœstrus II et le matin du proœstrus est la très forte augmentation des taux d'œstrogènes plasmatiques, il y a une très forte probabilité pour que les œstrogènes soient les principaux moteurs de ces phénomènes de plasticité morphologique. Cette hypothèse est renforcée par le fait que des récepteurs aux œstrogènes sont exprimés par certains tanocytes et certaines cellules endothéliales de l'éminence médiane (Langub et Watson, 1992). Il est fortement probable que les œstrogènes induisent la synthèse par les tanocytes et/ou les cellules endothéliales de facteurs facilitateurs de la sécrétion de GnRH et/ou moteurs de plasticité.

Les travaux de l'équipe d'Ojeda suggèrent que l'un des principaux candidats pourrait être le TGF $\alpha$ , facteur exprimé par les tanocytes (Ma *et al.*, 1992) et qui stimule la sécrétion de GnRH *in vitro* (Ojeda *et al.*, 1990 ; Voigt *et al.*, 1996) et *in vivo* (Ma *et al.*, 1992 ; Rage *et al.*, 1997b). En effet, la synthèse du TGF $\alpha$  par les cellules gliales de l'hypothalamus (Ma *et al.*, 1994 ; Voigt *et al.*, 1996) varie au cours du cycle œstral et est maximale le jour du

proestrus (Ma *et al.*, 1992). D'autres cytokines connues pour stimuler la libération de GnRH, tels que les IGFs (Hiney *et al.*, 1991, 1996), le TGF $\beta_1$  (Melcangi *et al.*, 1995) et l'activine (Gonzalez-Manchon *et al.*, 1991 ; Calogero *et al.*, 1998), pourraient aussi être impliquées dans l'induction de phénomènes de plasticité stéroïdo-dépendants dans la zone externe de l'éminence médiane.

D'après Fernandez-Galaz *et al.* (1997), l'IGF-I serait impliqué dans le déclenchement des remaniements morphologiques induits par les œstrogènes au niveau du noyau arqué chez la rate le jour du proestrus et de l'estrus (Garcia-Segura *et al.*, 1994 ; Fernandez-Galaz *et al.*, 1997). L'équipe de Garcia-Segura a en effet montré l'existence, dans le noyau arqué, d'un cycle complet de désafférentation et de réafférentation au niveau de corps cellulaires de certains neurones s'opérant sur 48 h au cours du cycle œstral (Olmos *et al.*, 1989). Les connections axo-somatiques affectées par les œstrogènes le jour du proestrus seraient de nature GABAergique (Parducz *et al.*, 1993). Le retrait de ces afférences inhibitrices, induit par les œstrogènes, pourrait contribuer à l'augmentation de l'activité électrique des neurones du noyau arqué enregistrée au moment de la survenue du pic préovulatoire de LH (Yeoman et Jenkins, 1989). L'IGF-I serait impliqué dans le déclenchement de ces phénomènes de plasticité et, pourrait soit être synthétisé localement par les astrocytes (Garcia-Segura *et al.*, 1991 ; Duenas *et al.*, 1994), soit provenir de la circulation porte hypophysaire (Fernandez-Galaz *et al.*, 1997). D'après Fernandez-Galaz *et al.* (1997), l'IGF-I passerait du sang porte au troisième ventricule par l'intermédiaire des tanocytes, dont l'immunoréactivité pour ce facteur varie au cours du cycle œstral (Duenas *et al.*, 1994). L'IGF-I serait ensuite redistribué à partir du troisième ventricule aux neurones du noyau arqué pour en réguler l'activité. Les œstrogènes pourraient réguler l'apport d'IGF-I dans le noyau arqué en régulant la capture de ce facteur par les tanocytes dans le sang porte (Fernandez-Galaz *et al.*, 1996). Par conséquent l'IGF-I, en plus de réguler la connectivité des neurones du noyau arqué, pourrait contribuer, le jour du proestrus, à moduler l'accès des terminaisons à GnRH à l'espace péricapillaire, dans la zone externe de l'éminence médiane.

Par ailleurs, l'endothélium des capillaires porte pourrait comme les tanocytes jouer un rôle important dans l'induction des phénomènes de plasticité de la zone externe de l'éminence médiane. En effet, les cellules endothéliales sont connues pour sécréter de nombreux facteurs de croissances, tels que l'IL-8 (Hofman *et al.*, 1998), le VEGF (Mandriota

*et al.*, 1996), le FGF-2 (Gonzalez *et al.*, 1994), l'IGF-I (Delafontaine *et al.*, 1991), l'activine (Yang et Zhang, 1995), le TGF $\beta$  (Hannan *et al.*, 1988 ; Chua *et al.*, 1994), et une étude préliminaire de Robinson *et al.* (1998) semble montrer que les cellules endothéliales en co-culture avec des fragments d'aire préoptique sont capables d'attirer les fibres des neurones à GnRH via la sécrétion de molécules solubles. De plus, les cellules endothéliales (Stefano *et al.*, 1995) sont capables de produire un facteur non seulement connu pour stimuler la libération de GnRH, mais aussi pour induire des remaniements morphologiques de la glie (Ramsell et Cobbett, 1996) : le NO. Cette sécrétion de NO par les cellules endothéliales pourrait de surcroît être directement régulée par les œstrogènes (Hayashi *et al.*, 1995 ; Latin-Hermoso *et al.*, 1997).

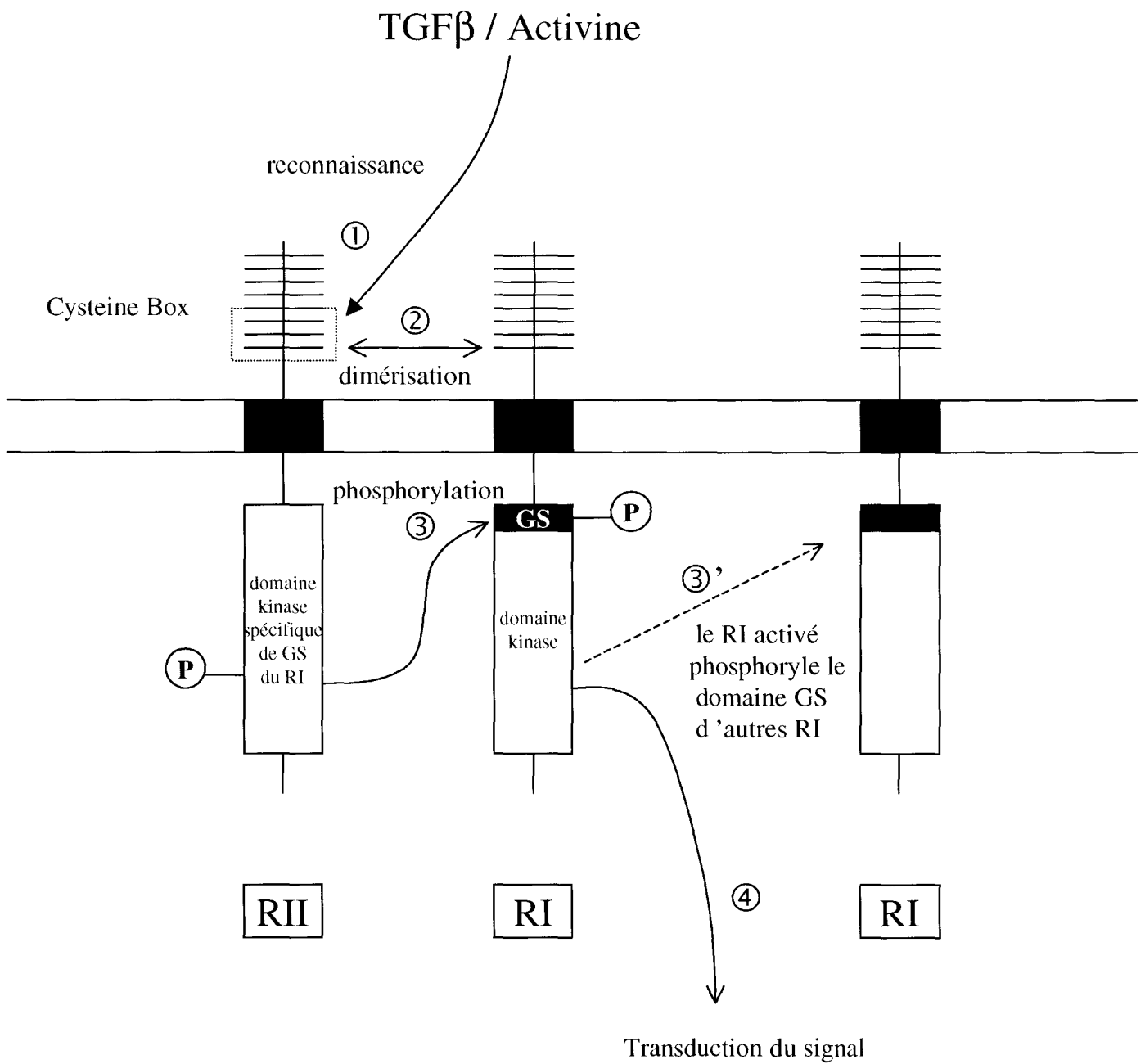
En résumé nos travaux réalisés à l'échelle ultrastructurale montrent de manière définitive l'existence d'une plasticité morphologique de la zone externe de l'éminence médiane régulant l'accès des terminaisons à GnRH à l'espace péricapillaire au cours du cycle œstral. Cette plasticité suppose une interaction dynamique entre les différents éléments cellulaires de cette région : les terminaisons à GnRH, les tanocytes et les cellules endothéliales. Elle implique une synthèse de lame basale, un remaniement du cytosquelette des tanocytes et très probablement une pousse des axones des neurones à GnRH. Par ailleurs, l'endothélium, par la sécrétion de facteurs stimulant la libération de GnRH et/ou le remaniement morphologique de la zone externe de l'éminence médiane, pourrait aussi jouer un rôle important. L'élément déclencheur des remaniements morphologiques observés le jour du proestrus semble être l'élévation du taux d'œstrogènes plasmatique entre le soir du diestrus II et la matin du proestrus qui pourrait stimuler la sécrétion de substances induisant une plasticité. Ainsi, le déclenchement de phénomènes de plasticité dans la zone externe de l'éminence médiane pourrait constituer l'une des voies par lesquelles les œstrogènes exercent leur rétroaction positive sur l'axe reproducteur le jour du proestrus. Mais cette plasticité pourrait aussi constituer un moyen pour les œstrogènes d'exercer leur rétroaction négative sur l'activité du système à GnRH, en figeant la zone externe de l'éminence médiane les autres jours du cycle, afin de ne permettre l'accès à l'espace péricapillaire qu'aux terminaisons à GnRH responsables de la sécrétion basale du décapeptide.

## I.B. Activine et/ou TGF $\beta$ <sub>1</sub> médiateurs de plasticité ?

L'étude de l'expression de l'ARNm du récepteur sérine-thréonine kinase au TGF $\beta$  et/ou à l'activine (B1) dans le diencephale montre que l'ARNm de ce récepteur est fortement exprimé dans les différentes régions et noyaux impliqués dans le contrôle de l'activité du système à GnRH, tels que les bandes diagonales de Broca, l'aire préoptique, le noyau arqué et l'éminence médiane. Notamment, un intense marquage pour l'ARNm du récepteur B1 est observé dans le noyau périventriculaire antéroventral (AVPv) et le noyau arqué, noyaux particulièrement impliqués dans la rétroaction positive des œstrogènes conduisant à l'induction du pic préovulatoire de GnRH/LH (voir pour revue Herbison, 1998). De plus, une forte expression de l'ARNm du récepteur B1 est visualisée dans le noyau préoptique médian (MnPO), noyau où sont localisés la plupart des corps cellulaires des neurones à GnRH de l'aire préoptique rostrale. Par double hybridation *in situ*, nous avons montré que certains neurones à GnRH exprimaient l'ARNm du récepteur B1. Ce résultat suggère donc que le TGF $\beta$  et/ou l'activine pourraient directement réguler l'activité des neurones à GnRH *in vivo*, comme cela semble être le cas *in vitro* (Melcangi *et al.*, 1995 ; Galbiati *et al.*, 1996 ; Gonzalez-Manchon *et al.*, 1991). Ainsi, le récepteur B1 pourrait être exprimé à la surface des corps cellulaires des neurones à GnRH dans l'aire préoptique, mais aussi, être exporté dans l'éminence médiane, au niveau de leur terminaison nerveuse, où par ailleurs, l'ARNm de B1 est intensément exprimé dans les tancytes et les capillaires du plexus porte. En résumé, l'étude par hybridation *in situ* de l'expression de l'ARNm du récepteur B1 dans le diencephale, suggère une forte implication de ce récepteur dans le contrôle de la sécrétion de GnRH.

Etant donné que l'ARNm du récepteur B1 est exprimé à la fois dans les neurones à GnRH, dans les tancytes et dans les capillaires du plexus porte, le TGF $\beta$  et/ou l'activine pourraient être impliqués dans le contrôle des phénomènes de plasticité de la zone externe de l'éminence médiane qui régulent au cours du cycle œstral l'accès des terminaisons à GnRH à l'espace péricapillaire. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que le TGF $\beta$ <sub>1</sub>, l'un des TGF $\beta$  qui peut activer le récepteur B1 (Takumi *et al.*, 1995), est connu pour moduler la synthèse des protéines du cytosquelette des astrocytes, telles que la GFAP (Laping *et al.*, 1994 ; Reilly *et al.*, 1998) et la vimentine (Krohn *et al.*, 1995). Par ailleurs le TGF $\beta$ <sub>1</sub> est aussi





**Figure 5.** Mode d'action du TGFβ et de l'activine sur leurs récepteurs à sérine thréonine kinase

capable d'induire un remaniement rapide du cytosquelette d'astrocytes en culture, sans synthèse *de novo* de protéines (Gagelin *et al.*, 1995). De plus le  $TGF\beta_1$ , par une action sur les corps cellulaires des neurones à GnRH peut stimuler la pousse de leur neurites dans la zone externe de l'éminence médiane puisque ce facteur est connu pour stimuler l'expression de l'ARNm de la tubuline  $\alpha_1$  (Laping *et al.*, 1994) qui est le plus souvent associée à une pousse axonale (Miller *et al.*, 1987, 1989). Enfin, le  $TGF\beta_1$  est connu pour stimuler *in vivo* l'angiogénèse (Roberts *et al.*, 1986 ; Yang et Moses, 1990) et *in vitro* la morphogénèse des capillaires (Madri *et al.*, 1988 ; Choi et Ballerman, 1995). Ainsi, le  $TGF\beta_1$  pourrait aussi être impliqué dans l'induction des remaniements morphologiques conduisant à l'augmentation du pourcentage d'évagination de l'espace péricapillaire dans la zone externe de l'éminence médiane le jour du proestrus. L'activine, autre cytokine appartenant à la superfamille des  $TGF\beta$  (Mason *et al.*, 1985), quant à elle, semblerait aussi favoriser la morphogénèse *in vitro* des capillaires, en inhibant la prolifération des cellules endothéliales et favorisant ainsi la différenciation des capillaires (McCarthy et Bicknell, 1993). Par contre, l'effet de l'activine sur l'expression ou le remaniement des protéines du cytosquelette des cellules gliales et des neurones restent inexplorés. L'activine est par ailleurs connue pour stimuler la sécrétion de GnRH par les neurones GT1 en culture (Gonzales-Manchon *et al.*, 1991), comme le  $TGF\beta_1$  (Melcangi *et al.*, 1995), mais aussi pour stimuler la sécrétion de GnRH par des fragments d'hypothalamus maintenus *ex vivo* (Calogero *et al.*, 1998).

Les  $TGF\beta_{1-3}$  et l'activine se lient sur un complexe hétérodymérique constitué d'un récepteur sérine thréonine kinase de type I et d'un récepteur sérine thréonine kinase de type II (Lin *et al.*, 1992 ; Logan *et al.*, 1992). Le ligand se lie sur le récepteur de type II qui active le récepteur de type I, et forment un complexe hétérodymérique responsable de la transduction du signal (Figure 5.). Ainsi, la spécificité du ligand qui agit sur le type cellulaire qui exprime le récepteur B1, récepteur sérine thréonine kinase de type I, est conférée par le récepteur sérine thréonine kinase de type II coexprimé avec B1 (Takumi *et al.*, 1995). En effet, Takumi *et al.* (1995) ont montré que si un récepteur de type II spécifique de l'activine était transfecté dans un type cellulaire exprimant B1, seule l'activine avait un effet, alors que si un récepteur de type II spécifique du  $TGF\beta$  était transfecté dans un type cellulaire identique, seuls le  $TGF\beta_1$  et le  $TGF\beta_3$  mais pas le  $TGF\beta_2$ , avaient un effet. Par hybridation *in situ*, nous avons montré que de nombreuses cellules du diencephale exprimaient B1 mais,

dans l'état actuel de nos travaux, il nous est impossible de trancher pour une activation de ces cellules par l'activine et/ou par le TGF $\beta$ . Cependant, les récepteurs de type II clonés jusqu'à maintenant ne semblent pas être exprimés dans le cerveau (Morita *et al.*, 1996). De plus aucune étude de liaison pour le TGF $\beta$  n'a été entreprise dans le SNC, de sorte que nous ne pouvons pas savoir à l'heure actuelle, si le TGF $\beta$  a, ou non, dans des conditions physiologiques, une action sur les types cellulaires du diencéphale exprimant B1. Cependant, la comparaison de l'aire de répartition des cellules exprimant B1 avec celles des sites de liaisons pour l'activine (Jakeman *et al.*, 1992), et des cellules exprimant l'ARNm du récepteur de type II à l'activine (Cameron *et al.*, 1994) montre un fort recouvrement. Ces données suggèrent que le récepteur B1 serait très probablement le médiateur de l'effet de l'activine sur l'axe reproducteur au niveau hypothalamique.

## **II. Modulation de la sécrétion de GnRH dans l'éminence médiane**

### **II.A Variation du contenu des terminaisons à GnRH en décapeptide au cours du cycle œstral**

La quantification du nombre de grains d'or colloïdaux contenu dans chaque terminaison à GnRH immunomarquée de la zone externe de l'éminence médiane nous a permis de montrer que dans les terminaisons de la zone externe de l'éminence médiane le contenu en GnRH variait au cours du cycle œstral. De plus, une telle quantification nous a permis d'établir que cette variation de charge pourrait être la cause de la variation du nombre de terminaisons à GnRH immunoréactives dans la zone externe de l'éminence médiane au cours du cycle œstral. Ainsi, selon leur contenu en décapeptide, les terminaisons nerveuses à GnRH pourraient passer alternativement au dessus et au dessous du seuil d'immunodectabilité. Ces résultats, associés à ceux des différentes études montrant une variation du contenu en GnRH de l'hypothalamus médiobasal au cours du cycle œstral (Araki *et al.*, 1975 ; Parnet *et al.*, 1990), suggèrent l'existence d'une forte variation de l'activité de synthèse du décapeptide au niveau des corps cellulaires des neurones à GnRH et de son transport vers les terminaisons, en plus d'une modulation de sa libération (Park et

Ramirez, 1989 ; Sarkar et Minami, 1995). Les variations de la synthèse de GnRH au cours du cycle œstral sont jusqu'alors difficiles à relier à une variation de l'expression de l'ARNm de la GnRH, étant donné les nombreuses études contradictoires sur le sujet (Zoeller et Young, 1988 ; Park *et al.*, 1990 ; Malik *et al.*, 1991 ; Marks *et al.*, 1993, 1994 ; Porkka-Heiskanen *et al.*, 1994 ; Gore et Robert, 1995 ; Suzuki *et al.*, 1995).

Nous observons de manière frappante et inattendue une mise en charge des terminaisons à GnRH en décapeptide à 9h le matin du proestrus, puis une vidange de ces dernières une heure après, suggérant l'existence d'une libération de GnRH dans le sang porte hypophysaire le matin du proestrus. Nos résultats sont en accord avec ceux d'Araki *et al.* (1975), montrant que le contenu en GnRH de l'hypothalamus médiobasal augmente à 8h le jour du proestrus, et décroît fortement à 11h. De plus, Fink et Jameison (1976) montrent que des stimulations électriques de l'aire préoptique à 9h le matin du proestrus entraînent une importante élévation des taux de GnRH dans le sang porte hypophysaire, indiquant qu'à ce moment du cycle œstral d'importants pools de GnRH sont prêts à être libérés dans la circulation porte. Le principal facteur déclencheur de l'augmentation de l'activité du système à GnRH dès le matin du proestrus pourrait être la très forte élévation du taux d'œstrogènes dans la circulation générale entre le soir du diestrus II et le matin du proestrus. En effet, les œstrogènes sont connus pour induire une augmentation de l'activité sécrétoire du système à GnRH chez les femelles ovariectomisées (Dulzen et Ramirez, 1986), et chez les rates cycliques entre le soir du diœstrus et le matin du proestrus (Kalra et Kalra, 1974 ; Smith, Freeman et Neill, 1975). La sécrétion spontanée de GnRH dans le sang porte le matin du proestrus, sans répercussion sur les taux plasmatiques de LH, pourrait être impliquée dans le phénomène d'auto-amorçage de l'axe gonadotrope énoncé par Fink (1995), en induisant une augmentation de l'expression du gène du récepteur de la GnRH par les cellules gonadotropes (Kaiser *et al.*, 1993 ; Bauer-Dantoin, Hollenberg et Jameson, 1993) et ainsi une augmentation de la sensibilité de ces cellules à la GnRH (Aiyer *et al.*, 1974 ; Gordon et Reichlin, 1974 ; Cooper *et al.*, 1974). En effet, la sensibilité de l'antéhypophyse à une stimulation par la GnRH le matin du proestrus est aussi faible que celle observée les autres jours du cycle, alors qu'à 13h proestrus elle est maximale (Cooper *et al.*, 1974). Bauer-Dantoin, Hollenberg et Jameson (1993) montrent que le taux d'ARNm du récepteur à la GnRH dans l'hypophyse s'accroît fortement entre 9h et 12h le jour du proestrus, pour atteindre un taux d'expression

trois fois plus important que celui trouvé à 9h le jour du diestrus. Cette augmentation du taux d'ARNm du récepteur à la GnRH survient trois heures après l'élévation du taux d'œstradiol et précède de six heures la survenue du pic préovulatoire de LH (Bauer-Dantoin, Hollenberg et Jameson, 1993) ce qui est en parfaite concordance avec les phénomènes de mise en charge et de vidange que nous observons pour les terminaisons nerveuses à GnRH de la zone externe de l'éminence médiane.

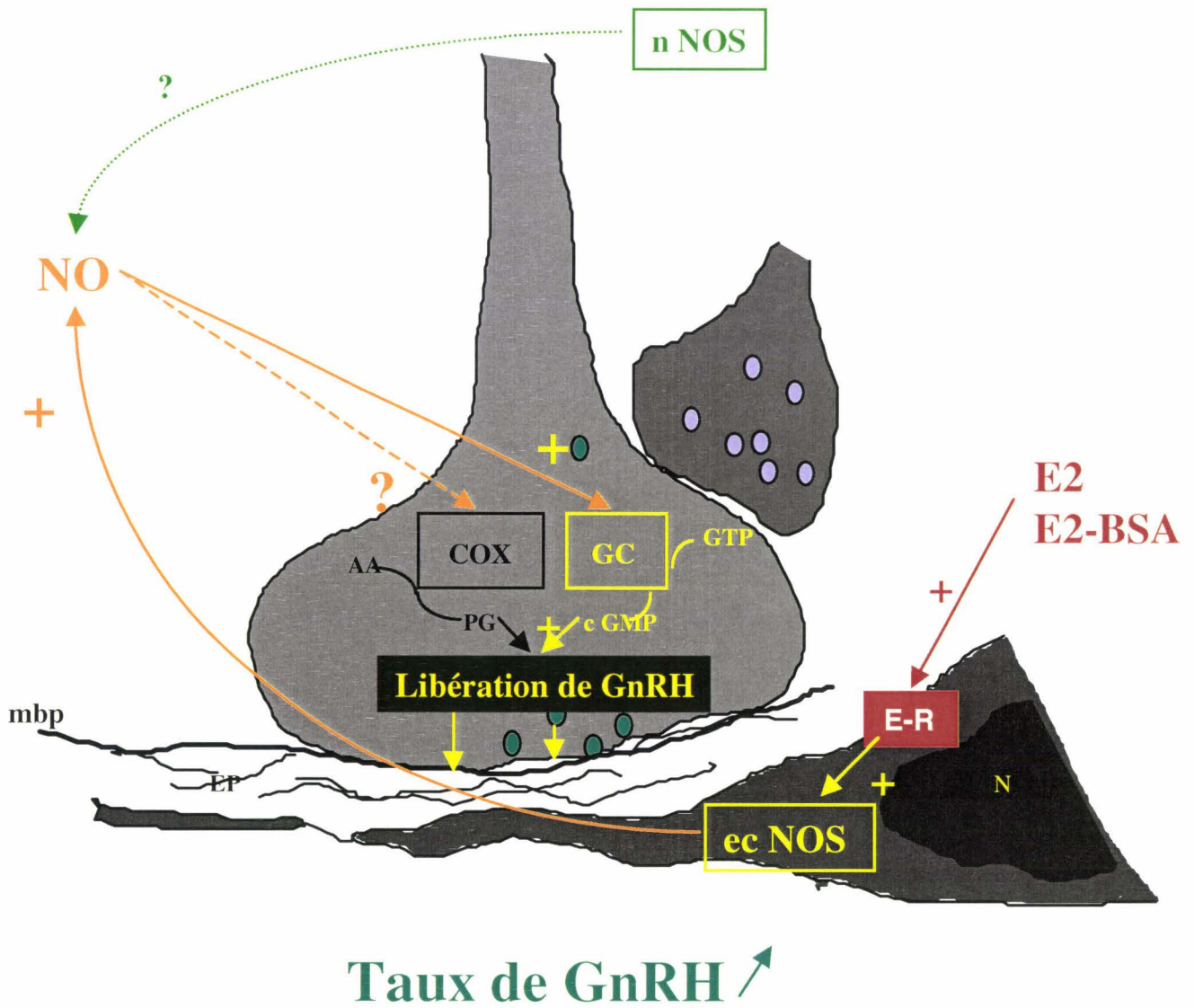
En résumé, une sécrétion de GnRH le matin du proestrus pourrait préparer l'hypophyse à l'arrivée massive de décapeptide dans le sang porte hypophysaire le soir du proestrus et ainsi constituer un auto-amorçage de l'axe gonadotrope permettant la survenue du pic préovulatoire de LH.

Par ailleurs, l'après-midi du proestrus, nous observons concomitamment à la survenue du pic préovulatoire de LH, une nouvelle mise en charge des terminaisons nerveuses à GnRH en décapeptide. L'obtention d'un pic de concentration de la GnRH dans les terminaisons nerveuses de la zone externe de l'éminence médiane à 18h le jour du proestrus est en parfait accord avec les résultats de nombreuses études montrant la survenue d'un pic préovulatoire de GnRH dans la sang porte hypophysaire (Sarkar, Chiappa et Fink, 1976 ; Fink, Sarkar et Chiappa, 1977 ; Ching, 1982 ; sherwood *et al.*, 1980 ; Levine et Ramirez, 1982) et l'augmentation de la concentration de GnRH dans l'hypothalamus médiobasal à cette période (Araki *et al.*, 1975 ; Parnet *et al.*, 1990). Nous noterons par ailleurs que cet événement survient au moment du cycle œstral où la plus grande proportion des neurones à GnRH expriment Fos (Lee, Smith et Hoffman, 1990 ; Rubin, Mitchell et King, 1995 ; Wang, Hoffman et Smith, 1995), témoignant de la forte activité du système à GnRH. L'ensemble de ces résultats combinés aux nôtres semblent montrer qu'à cette période du cycle œstral, l'activité des neurones à GnRH est telle qu'elle permet non seulement une libération massive de GnRH dans le sang porte hypophysaire mais aussi le réapprovisionnement continu des importants stocks de GnRH au niveau des terminaisons nerveuses de la zone externe de l'éminence médiane.

## II.B. Implication du NO dans la modulation de la libération de GnRH au niveau de l'éminence médiane

Certaines équipes ont montré de manière indirecte l'implication du NO sur la libération de GnRH au niveau de l'éminence médiane (Rettori *et al.*, 1992, 1993, 1997 ; Bonavera *et al.*, 1993, 1996 ; Seilicovich *et al.*, 1995 ; Canteros *et al.*, 1996 ; Bhat *et al.*, 1998). L'utilisation d'une méthode ampérométrique, nous a permis pour la première fois d'étudier en temps réel la sécrétion de NO induite par l'activation spécifique de certains récepteurs dans l'éminence médiane, *ex vivo*. Les résultats montrent que la libération de NO survient dans les secondes qui suivent l'addition de molécules qui stimulent sa sécrétion, et que cette libération est directement corrélée à une libération de GnRH dans le milieu. Lors d'une première étude nous avons montré que la morphine et l'anandamide stimulaient une sécrétion rapide de NO via l'activation des récepteur  $\mu_3$  et CB1, respectivement, et que cette libération de NO pouvait avoir un effet différentiel sur la sécrétion de neurohormones préhypophysiotropes selon la concentration de NO libéré. En effet, la morphine stimule, via une sécrétion de NO, la libération de GnRH et de CRF, alors que l'anandamide, qui entraîne une sécrétion de NO en moyenne deux fois moins importante que celle induite par la morphine, ne stimule que la libération de GnRH. Ainsi, il apparaît exister, pour les terminaisons CRF, un seuil de sensibilité au NO compris entre la quantité de NO libérée par l'anandamide (7 nM) et celle libérée par la morphine (14 nM). De plus l'effet du NO sur la sécrétion des neurohormones apparaît être dose-dépendant : 1  $\mu$ M de SNAP, concentration d'un donneur de NO permettant la libération d'une quantité de gaz équivalente à 500 nM, permet une libération de GnRH et de CRF significativement plus importantes que celles induites par la morphine (14 nM de NO libéré).

L'implication physiologique de notre étude semble importante du fait que nous avons stimulé la sécrétion de NO par des fragments d'éminence médiane via l'activation sélective des récepteurs  $\mu_3$  et CB1. L'action de la morphine sur le récepteur  $\mu_3$ , caractérisé par Stefano *et al.* en 1993 comme étant un récepteur aux opiacés insensibles aux peptides opioïdes, suggère que des opiacés endogènes, jusqu'alors non découverts, pourraient activer cette voie *in vivo*. De plus, l'implication du récepteur  $\mu_3$  dans la sécrétion de NO induite par la morphine, nous a permis dès cette première étude, d'émettre l'hypothèse que le NO sécrété



**Figure 6.** Stimulation de la libération de GnRH par l'œstradiol via la stimulation de la sécrétion de NO d'origine endothéliale

E-R: récepteur membranaire aux estrogènes  
 COX: cyclooxygénase  
 GC: guanylyl cyclase  
 AA: acide arachidonique  
 PG: prostaglandines  
 EP: espace péricapillaire  
 mbp: lame basale parenchymateuse

par les fragments d'éminence médiane était d'origine endothéliale. En effet, de récentes études montrent que le récepteur  $\mu_3$  est exprimé dans les cellules endothéliales (Stefano *et al.*, 1995) et certains types de cellules gliales (Liu *et al.*, 1996). Or au niveau de l'éminence médiane l'immunoréactivité pour la NOS n'est observée qu'au niveau de fibres de neurones qui se projettent vers la neurohypophyse (Ceccatelli *et al.*, 1992 ; Yamada *et al.*, 1996 ; Herbisson *et al.*, 1996) et au niveau de l'endothélium des capillaires portes (Ceccatelli *et al.*, 1992 ; Yamada *et al.*, 1996). De plus aucune NOS n'a été jusqu'alors détectée dans des conditions physiologiques dans les cellules gliales (Forstermann et Kleinert, 1995 ; Stevens et Vo, 1998). L'hypothèse d'une origine endothéliale du NO sécrété par l'éminence médiane est confortée par le fait que le récepteur CB1, dont la stimulation par l'anandamide entraîne une libération de NO, est aussi connu pour être exprimé dans les capillaires (Deutsch *et al.*, 1997 ; Stefano *et al.*, 1998) et que l'anandamide ne présente pas de site de liaison dans le parenchyme nerveux de l'éminence médiane (Herkenham *et al.*, 1991). Ainsi cette étude a conduit à émettre pour la première fois l'hypothèse d'une possible implication de l'endothélium des capillaires porte hypophysaires dans la régulation des sécrétions neuroendocriniennes dans l'éminence médiane.

Lors d'une deuxième étude nous nous sommes intéressés à l'œstradiol qui est non seulement le facteur responsable du rétrocontrôle exercé par les gonades sur l'activité du système à GnRH (voir Herbisson, 1998 ; Chowen *et al.*, 1990), mais aussi un facteur connu pour être capable de stimuler l'expression de l'ARNm et de la protéine de l'ecNOS (Weiner *et al.*, 1994 ; Hayashi *et al.*, 1995), et même la sécrétion de NO par les cellules endothéliales (Hayashi *et al.*, 1995), chez le mâle et la femelle.

Nos résultats montrent que l'addition de  $17\beta$ -œstradiol sur des fragments d'éminence médiane de rat mâle, stimule dans les secondes qui suivent une sécrétion de NO qui, à son tour, induit une sécrétion de GnRH (Figure 6.). Cette action rapide de l'œstradiol semble passer par l'activation d'un récepteur spécifique de l'œstradiol, puisqu'elle est antagonisée par le tamoxifène, antagoniste des récepteurs aux œstrogènes, et que la  $17\alpha$ -œstradiol n'a aucun effet. De plus, la  $17\beta$ -œstradiol couplée à la sérum albumine bovine (E<sub>2</sub>-BSA), ne pouvant pas franchir la membrane plasmique, stimule la sécrétion de NO et de GnRH indiquant que ce récepteur aux œstrogènes serait membranaire. Les effets de l'E<sub>2</sub>-BSA sur la sécrétion de NO sont aussi antagonisés par le tamoxifène. Le NO libéré sous l'action de la



17 $\beta$ -œstradiol semble stimuler la libération de GnRH via l'activation des guanylyl cyclases solubles des terminaisons nerveuses à GnRH, du fait de l'inhibition de la libération du décapeptide par l'ODQ, inhibiteur spécifique des guanylyl cyclases sensibles au NO (Garthwaite *et al.*, 1995). Ce résultat est en accord avec différents travaux montrant que la stimulation de la libération de GnRH par le NO emprunte une voie de signalisation intracellulaire conduisant à la production de GMPc (Bonavera *et al.*, 1993 ; Moretto *et al.*, 1993 ; Pu *et al.*, 1996)

*Origine endothéliale du NO.* Le fait que le L-NIO, inhibiteur de l'activité NOS, inhibe la libération de GnRH induite par l'œstradiol dès  $5.10^{-7}$  M ( $5.10^{-7}$  M L-NIO = IC<sub>50</sub> ecNOS = 1/10 IC<sub>50</sub> nNOS) (Rees *et al.*, 1990 ; Moore *et al.*, 1994), montre que la sécrétion de NO induite par l'œstradiol est d'origine endothéliale. Ainsi, nos résultats suggèrent que le NO impliqué dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH au niveau de l'éminence médiane ne serait pas comme, dans l'aire préoptique, d'origine neuronale (Aguan *et al.*, 1996 ; Pu *et al.*, 1998a, 1998b). Morphologiquement cette hypothèse est compatible avec le fait que les terminaisons à GnRH sont proches des structures contenant de la ecNOS alors qu'elle sont éloignées des structures contenant de la nNOS (Herbisson *et al.*, 1996). En effet, les terminaisons à GnRH sont localisées à proximité immédiate des cellules endothéliales des capillaires porte hypophysaire immunoréactives pour la NOS (Yamada *et al.*, 1996). Cette hypothèse de l'origine endothéliale du NO impliqué dans la régulation de la libération de GnRH au niveau de l'éminence médiane est renforcée par les résultats d'une étude antérieure montrant que l'administration intracérébroventriculaire d'oligonucléotides antisens de l'ecNOS inhibait de manière plus efficace, la survenue du pic de LH induit par la progestérone chez des rates ovariectomisées traitées par l'œstradiol, que des oligonucléotides antisens de la nNOS (Aguan *et al.*, 1996).

*Récepteurs aux œstrogènes impliqués.* L'œstradiol est connue pour stimuler l'expression de l'ecNOS, 8h après son addition sur des cellules endothéliales de veines humaines, par une action sur son récepteur membranaire, et cet effet est inhibé par le tamoxifène (Hayashi *et al.*, 1995). La présence d'un élément de réponse aux œstrogènes sur le gène humain de l'ecNOS suppose un contrôle direct de sa transcription par le récepteur

aux œstrogènes (Miyahara *et al.*, 1994). Nos résultats suggèrent que dans l'éminence médiane l'œstradiol en plus d'avoir une action à long terme sur la synthèse de NO endothélial via l'activation de récepteurs nucléaires, pourrait stimuler une sécrétion aiguë de NO via l'activation d'un récepteur membranaire. Cependant cet effet est antagonisé par le tamoxifène qui est classiquement considéré comme étant un inhibiteur des récepteurs nucléaires aux œstrogènes. Cette constatation n'est cependant pas isolée car d'autres travaux (Wong et Moos, 1991 ; Drouva *et al.*, 1984) montrent aussi que le tamoxifène antagonise l'effet de l'œstradiol sur son (ses) récepteur(s) membranaire(s). Deux articles publiés en même temps que notre étude, en février 1999, confirment nos résultats et semblent indiquer que l'effet membranaire des œstrogènes sur les cellules endothéliales des capillaires de l'éminence médiane pourrait passer via l'activation des récepteurs "classiques" aux œstrogènes (Chen *et al.*, 1999) qui pourraient être exprimés au niveau de la membrane plasmique (Razandi *et al.*, 1999). Razandi *et al.* (1999) en particulier montrent par transfection des ADNc des récepteurs aux œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  dans des cellules CHO qu'une certaine proportion de ces récepteurs est exprimée sur la membrane plasmique des cellules. Ces récepteurs nucléaires et membranaires ont une affinité analogue pour la  $17\beta$ -œstradiol. La  $17\beta$ -œstradiol, par l'activation des récepteurs membranaires  $\alpha$  ou  $\beta$ , stimule entre autres la production d'AMPc et d'IP<sub>3</sub> (Razandi *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que dans l'éminence médiane l'œstradiol pourrait stimuler de manière aiguë la production de NO par les cellules endothéliales via l'activation des récepteurs membranaires aux œstrogènes  $\alpha$  et/ou  $\beta$ . L'activation de ces récepteurs pourraient conduire à la production d'IP<sub>3</sub>, puis à la mobilisation des stock intracellulaires de calcium et ainsi entraîner l'activation de l'ecNOS qui est une enzyme dépendante du calcium (Bredt et Snyder, 1990 ; Dawson et Snyder, 1994 ; forstermann et Kleinert, 1995).

Contrairement aux effets de la progestérone (voir pour revue Ramirez et Zheng, 1996), l'effet aigu des œstrogènes sur la sécrétion de GnRH par des fragments d'hypothalamus a été très peu étudié. Seuls Drouva *et al.* (1984) ont montré que la  $17\beta$ -œstradiol potentialisait la libération de GnRH induite par des concentrations élevées de potassium, 30 min après son addition sur des tranches d'hypothalamus médiobasal. Les auteurs en ont conclu à un effet membranaire (Drouva *et al.*, 1984). Nos résultats complètent cette observation en montrant que l'effet membranaire de l'œstradiol sur la

sécrétion de GnRH passe via la stimulation de la sécrétion de NO d'origine endothéliale. Nous émettons l'hypothèse que la libération de NO induite par l'œstradiol stimule la guanylyl cyclase soluble des terminaisons à GnRH et entraîne une production de GMPC, qui en activant des conductances cationiques entraînent une dépolarisation des terminaisons (Fesenko *et al.*, 1985) et ainsi la libération de GnRH (Drouva *et al.*, 1984). Cependant comme d'autres auteurs l'ont suggéré, le NO pourrait activer la cyclooxygénase des terminaisons à GnRH et/ou des cellules gliales et stimuler la synthèse de PGE<sub>2</sub> (Rettori *et al.*, 1992). Les PGE<sub>2</sub> entraîneraient alors la mobilisation des stocks intracellulaires de calcium (Ojeda et Negro-Vilar, 1985) et la production d'AMPc (Ojeda *et al.*, 1985), ce qui conduirait finalement à l'exocytose des granules de sécrétion contenant la GnRH (Rettori *et al.*, 1992). Cette hypothèse est renforcée par le fait que le récepteur aux PGE<sub>2</sub> est exprimé dans les neurones à GnRH (Rage *et al.*, 1997).

Chez le rat mâle, les taux plasmatiques d'œstrogènes, comme le montrent nos résultats, sont comparables à ceux trouvés chez la rate en début de proestrus. Une partie de cette œstradiol est issu de l'aromatation de la testostérone (Chowen *et al.*, 1990). Nous montrons dans cette étude que contrairement à l'œstradiol, la testostérone n'a aucun effet sur la sécrétion de NO par les fragments d'éminence médiane, ce qui suggère que la testostérone n'agit pas sur un récepteur membranaire couplé à une activité NOS et que la testostérone n'est pas aromatisée en œstradiol. Cette dernière observation est en accord avec le fait que l'aromatase n'est pas exprimée dans l'éminence médiane (Sanghera *et al.*, 1991). Chez le rat mâle, l'action de l'œstradiol sur la sécrétion de GnRH n'a jamais été étudiée. Seule une étude conduite chez la caille mâle adulte montre que la sécrétion basale de GnRH était rapidement accrue par une exposition sur des tranches d'hypothalamus à la 17 $\beta$ -œstradiol, alors que la testostérone n'avait aucun effet (Li *et al.*, 1994).

En résumé, des concentrations physiologiques de 17 $\beta$ -œstradiol, via l'activation d'un récepteur membranaire, stimulent la sécrétion de NO d'origine endothéliale qui induit une libération de GnRH par des fragments d'éminence médiane maintenus en survie. Ce phénomène pourrait jouer un rôle crucial dans la modulation de la sécrétion pulsatile de GnRH par les terminaisons nerveuses de la zone externe de l'éminence médiane (Purnelle *et*

*al.*, 1997 ; Lopez *et al.*, 1997), et pourrait être à l'origine de la synchronisation des neurones à GnRH anatomiquement dispersés (Lopez *et al.*, 1998). De plus, notre travail est le premier à démontrer une implication de l'endothélium vasculaire de l'éminence médiane dans la modulation des sécrétions neuroendocriniennes.

# CONCLUSION

## Conclusion

Lors de la première de partie notre travail de thèse, nous avons montré l'existence de phénomènes de plasticité morphologique dans la zone externe de l'éminence médiane, favorisant l'accès à l'espace péricapillaire des terminaisons à GnRH le jour du proœstrus. Cette situation faciliterait la sécrétion de la GnRH dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire. Les trois principaux protagonistes de ces remaniements morphologiques semblent être les neurones à GnRH, les tanocytes, et l'endothélium.

Certaines images de microscopie électronique montrant des évaginations de la membrane axoplasmique des terminaisons à GnRH orientées vers l'espace péricapillaire, puis parfois l'émission de fins prolongements vers ce dernier suggèrent que les neurones à GnRH sont capables de mouvement le jour du proœstrus. Cette déduction obtenue à partir d'images de microscopie électronique, semble être appuyée par le fait qu'un déterminant présynaptique intrinsèque de la repousse neuronale et de la plasticité chez l'animal adulte, le GAP-43, est fortement exprimé au niveau de l'éminence médiane (Alonso *et al.*, 1997), mais aussi, comme le montre des résultats très récents d'hybridation *in situ*, par le fait que l'ARNm de GAP-43 est exprimé dans les neurones à GnRH (Prévot *et al.*, communication personnelle).

Par ailleurs au niveau de la zone externe de l'éminence médiane, les études de quantification montrent que la lame basale parenchymateuse présente deux fois plus de villosités le jour du proœstrus que le jour du diœstrus. De tels remaniements morphologiques sous-entendent qu'il s'opère une synthèse *de novo* de lame basale, un remaniement du cytosquelette des tanocytes et une angiogénèse entre ces deux stades du cycle œstral. Une telle plasticité morphologique pourrait être induite par l'élévation des taux plasmatiques d'œstrogènes entre le soir du diœstrus II et le matin du proœstrus. Les œstrogènes pourraient, le jour du proœstrus, induire l'expression de certains constituants de la lame basale telle que la laminine (Shim *et al.*, 1997 ; Katayama *et al.*, 1998) par les

tancytes et les cellules endothéliales (Hagg *et al.*, 1997) qui sont deux types cellulaires qui expriment les récepteurs aux œstrogènes au niveau de l'éminence médiane (Langub et Watson, 1992). D'autres molécules que les œstrogènes sont connues pour affecter la composition de la matrice extracellulaire, et parmi elles, le  $TGF\beta_1$  (Mattson *et al.*, 1997). Or, les résultats que nous avons obtenus par hybridation *in situ* montrent l'expression d'un récepteur sérine-thréonine kinase de type I au  $TGF\beta_1$  et à l'activine dans les tancytes et les cellules endothéliales de l'éminence médiane, ainsi que dans les neurones à GnRH eux-mêmes, ce qui suggère que ce facteur de croissance pourrait être impliqué dans l'induction des phénomènes de plasticité observés dans la zone externe de l'éminence médiane. Le  $TGF\beta_1$  pourrait être sécrété au niveau de l'éminence médiane par les cellules gliales (Melcagi *et al.*, 1995) et/ou par les cellules endothéliales (Hannan *et al.*, 1988).

Ce facteur de croissance, en plus d'altérer la composition de la matrice extracellulaire, est connu (a) pour stimuler *in vitro* la sécrétion de GnRH (Melcangi *et al.*, 1995), (b) pour induire un remaniement rapide du cytosquelette des astrocytes en culture, sans synthèse *de novo* de protéines (Gagelin *et al.*, 1995), (c) pour stimuler l'expression de vimentine (Krohn *et al.*, 1995) et réprimer celle de GFAP (Toru-Delbauffe *et al.*, 1992), permettant ainsi la repousse neuronale après lésion (Lefrancois *et al.*, 1997), (d) pour stimuler *in vivo* l'angiogénèse (Roberts *et al.*, 1986 ; Yang et Moses, 1990).

L'hypothèse de l'implication du  $TGF\beta_1$  dans la modulation des phénomènes d'angiogénèse au niveau de l'éminence médiane est renforcée par des résultats préliminaires montrant par hybridation *in situ* l'expression de l'ARNm d'un récepteur de type II au  $TGF\beta$  en forte quantité dans les capillaires du plexus porte hypothalamo-hypophysaire (Prévoit *et al.*, communication personnelle).

Dans une deuxième partie de notre travail, nous avons pu déterminer que la libération de la GnRH par les fragments d'éminence médiane était sous le contrôle d'une sécrétion, par ces mêmes fragments, de NO d'origine endothéliale, et que cette sécrétion de NO pouvait être modulée par différentes molécules dont les œstrogènes. Ainsi, nous avons montré que l'endothélium pouvait jouer un rôle déterminant dans la régulation des sécrétions neuroendocriniennes au niveau de l'éminence médiane via une sécrétion de NO. Le NO, sécrété au niveau de l'éminence médiane, pourrait constituer le principal lien synchroniseur

de l'activité des neurones à GnRH anatomiquement très dispersés (Purnelle *et al.*, 1997 ; Lopez *et al.*, 1997 ; Lopez *et al.*, 1998). Nous noterons que le NO, en plus de réguler la libération de GnRH par les terminaisons nerveuses de la zone externe de l'éminence médiane, pourrait aussi être impliqué dans l'induction de phénomènes de plasticité dans cette région hypothalamique via la stimulation de la morphogénèse des capillaires (Papapetropoulos *et al.*, 1997 ; Poppa *et al.*, 1998) et/ou la stimulation d'un remaniement rapide du cytosquelette des tanocytes (Ramsell et Cobbett, 1996) et/ou un effet neurogénique sur les terminaisons à GnRH (Hindley *et al.*, 1997).

La suite logique à donner à notre travail sera d'identifier plus précisément la nature des interactions conduisant aux remaniements morphologiques permettant aux terminaisons à GnRH de contacter l'espace péricapillaire le jour du proœstrus.

Par ailleurs, nous poursuivrons les travaux permettant de déterminer la part du NO d'origine endothéliale dans la régulation de la sécrétion de la GnRH par les terminaisons nerveuses de l'éminence médiane. Le concept de l'implication de l'endothélium dans la régulation des sécrétions neuroendocriniennes au niveau de l'éminence médiane apparaît nouveau et intéressant à développer.



# **BIBLIOGRAPHIE**

## Bibliographie

- Abbud R, Smith MS 1991 Differences in the luteinizing hormone and prolactin responses to multiple injections of kainate, as compared to N-methyl-D,L-aspartate, in cycling rats. *Endocrinology* 129:3254-3258
- Abbud R, Smith MS 1995 Do GnRH neurons express the gene for the NMDA receptor? *Brain Res* 690:117-120
- Aguan K, Mahesh VB, Ping L, Bhat G, Brann DW 1996 Evidence for a physiological role for nitric oxide in the regulation of the LH surge: effect of central administration of antisense oligonucleotides to nitric oxide synthase. *Neuroendocrinology* 64:449-455
- Ahima RS, Harlan RE 1992 Glucocorticoid receptors in LHRH neurons. *Neuroendocrinology* 56:845-850
- Aiyer MS, Fink G, Greig F 1974 Changes in the sensitivity of the pituitary gland to luteinizing hormone releasing factor during the oestrous cycle of the rat. *J Endocrinol* 60:47-64
- Akema T, Chiba A, Kimura F 1990 On the relationship between noradrenergic stimulatory and GABAergic inhibitory systems in the control of luteinizing hormone secretion in female rats. *Neuroendocrinology* 52:566-572
- Akema T, Praputpittaya C, Kimura F 1987 Effects of preoptic microinjection of neurotensin on luteinizing hormone secretion in unanesthetized ovariectomized rats with or without estrogen priming. *Neuroendocrinology* 46:345-349
- Alexander MJ, Mahoney PD, Ferris CF, Carraway RE, Leeman SE 1989 Evidence that neurotensin participates in the central regulation of the preovulatory surge of luteinizing hormone in the rat. *Endocrinology* 124:783-788
- Almeida OF, Nikolarakis KE, Herz A 1988 Evidence for the involvement of endogenous opioids in the inhibition of luteinizing hormone by corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* 122:1034-1041

- Alonso G, Prieto M, Legrand A, Chauvet N 1997 PSA-NCAM and B-50/GAP-43 are coexpressed by specific neuronal systems of the adult rat mediobasal hypothalamus that exhibit remarkable capacities for morphological plasticity. *J Comp Neurol* 384:181-199
- Amoss M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R 1971 Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem Biophys Res Commun*, 44:205-10
- Anderson R, Mitchell R 1986 Uptake and autoreceptor-controlled release of [3H]-GABA by the hypothalamic median eminence and pituitary neurointermediate lobe. *Neuroendocrinology* 42:277-284
- Araki S, Ferin M, Zimmerman EA, Vande Wiele RL 1975 Ovarian modulation of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) in the rat brain: evidence for a differential effect on the anterior and mid-hypothalamus. *Endocrinology* 96:644-650
- Arias P, Jarry H, Leonhardt S, Moguilevsky JA, Wuttke W 1993 Estradiol modulates the LH release response to N-methyl-D-aspartate in adult female rats: studies on hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone and neurotransmitter release. *Neuroendocrinology* 57:710-715
- Barry J 1967 Morphologie et structure de l'infundibulum chez les mammifères. *Rev Eur endocr* 4:267-304
- Barry J 1979 Immunohistochemistry of luteinizing hormone-releasing hormone-producing neurons of the vertebrates. *Int Rev Cytol* 60:179-221
- Barry J, Dubois MP, Poulain P 1973a LRF producing cells of the mammalian hypothalamus. A fluorescent antibody study. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 146:351-366
- Barry J, Dubois MP, Poulain P, Leonardelli J 1973b Characteristics and topography of immunoreactive hypothalamic neurons with antibodies against synthetic LRF *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 276:3191-3193
- Barry J, Hoffman GE, Wray S 1985 LHRH-containing systems. *Handbook of chemical neuroanatomy*. Vol.4 : GABA and neuropeptides in the CNS, Part I. Elsevier Science
- Bauer-Dantoin AC, Hollenberg AN, Jameson JL 1993 Dynamic regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in the anterior pituitary gland during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 133:1911-1914

- Bauer-Dantoin AC, Urban JH, Levine JE 1992 Neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus is increased during preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology* 131:2953-2958
- Beauvillain JC, Moyses E, Dutriez I, Mitchell V, Poulain P, Mazzuca M 1992 Localization of mu opioid receptors on the membranes of nerve endings and tanycytes in the guinea-pig median eminence by electron microscopic radioautography. *Neuroscience* 49:925-936
- Beauvillain JC, Tramu G, Garaud JC 1984 Coexistence of substances related to enkephalin and somatostatin in granules of the guinea-pig median eminence: demonstration by use of colloidal gold immunocytochemical methods. *Brain Res* 301:389-393.
- Belsham DD, Wetsel WC, Mellon PL 1996 NMDA and nitric oxide act through the cGMP signal transduction pathway to repress hypothalamic gonadotropin-releasing hormone gene expression. *EMBO J* 15:538-547
- Benowitz LI, Routtenberg A 1997 GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20:84-91
- Bergen HT, Hejtmancik JF, Pfaff DW 1991 Effects of gamma-aminobutyric acid receptor agonists and antagonist on LHRH-synthesizing neurons as detected by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Exp Brain Res* 87:46-56
- Besecke LM, Levine JE 1994 Acute increase in responsiveness of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone nerve terminals to neuropeptide-Y stimulation before the preovulatory LH surge. *Endocrinology* 135:63-66
- Bhat GK, Mahesh VB, Lamar CA, Ping L, Aguan K, Brann DW 1995 Histochemical localization of nitric oxide neurons in the hypothalamus: association with gonadotropin-releasing hormone neurons and co-localization with N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroendocrinology* 62:187-197
- Bhat GK, Mahesh VB, Ping L, Chorich L, Wiedmeier VT, Brann DW 1998 Opioid-glutamate-nitric oxide connection in the regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 139:955-960
- Bicknell RJ 1985 Endogenous opioid peptides and hypothalamic neuroendocrine neurones. *J Endocrinol* 107:437-446

- Blasquez C, Jegou S, Feuilloley M, Rosier A, Vandesande F, Vaudry H 1994 Visualization of gamma-aminobutyric acid A receptors on proopiomelanocortin-producing neurons in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 135:2759-2764
- Bloom F, Battenberg E, Rossier J, Ling N, Guillemin R 1978 Neurons containing beta-endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: immunocytochemical studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:1591-1595
- Bonavera JJ, Kalra PS, Kalra SP 1996 L-arginine/nitric oxide amplifies the magnitude and duration of the luteinizing hormone surge induced by estrogen: involvement of neuropeptide Y. *Endocrinology* 137:1956-1962
- Bonavera JJ, Kalra SP, Kalra PS 1993 Evidence that luteinizing hormone suppression in response to inhibitory neuropeptides, beta-endorphin, interleukin-1 beta, and neuropeptide-K, may involve excitatory amino acids. *Endocrinology* 133:178-182
- Bonavera JJ, Sahu A, Kalra PS, Kalra SP 1994 Evidence in support of nitric oxide (NO) involvement in the cyclic release of prolactin and LH surges. *Brain Res* 660:175-179
- Bonfanti L, Olive S, Poulain DA, Theodosis DT 1992 Mapping of the distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule throughout the central nervous system of the adult rat: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 49:419-436
- Bouchaud C, Bosler O (1986) The circumventricular organs of the mammalian brain with special reference to monoaminergic innervation. *Int Rev Cytol* 105:283-327.
- Bouret S, Prevot V, Howard AD, Habert-Ortoli E, Jegou S, Vaudry H, Vermersch P, Beauvillain JC, Mitchell V 1998 Differential coexpression of galanin receptor (GalR1, GalR2) and proopiomelanocortin mRNAs in the rat arcuate nucleus. *Soc. Neurosc. Abst.* 632.15
- Bourguignon JP, Franchimont P 1981 libération intermittente de GnRH par l'hypothalamus de rat *in vitro*. *C R Seances Soc Biol* 175:389-96
- Bourguignon JP, Franchimont P 1984 Puberty-related increase in episodic LHRH release from rat hypothalamus *in vitro*. *Endocrinology* 114:1941-1943
- Bourguignon JP, Gerard A, Alvarez Gonzalez ML, Franchimont P 1993 Acute suppression of gonadotropin-releasing hormone secretion by insulin-like growth factor I and subproducts: an age-dependent endocrine effect. *Neuroendocrinology* 58:525-530

- Bourguignon JP, Gerard A, Debougnoux G, Rose J, Franchimont P 1987 Pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the rat hypothalamus in vitro: calcium and glucose dependency and inhibition by superactive GnRH analogs. *Endocrinology* 121:993-999
- Bourguignon JP, Gerard A, Franchimont P 1989 Direct activation of gonadotropin-releasing hormone secretion through different receptors to neuroexcitatory amino acids. *Neuroendocrinology* 49:402-408
- Bourguignon JP, Gerard A, Mathieu J, Simons J, Franchimont P 1989 Pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone from hypothalamic explants is restrained by blockade of N-methyl-D,L-aspartate receptors. *Endocrinology* 125:1090-1096
- Brann DW 1995 Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 61:213-225
- Brann DW, Mahesh VB 1991 Endogenous excitatory amino acid involvement in the preovulatory and steroid-induced surge of gonadotropins in the female rat. *Endocrinology* 128:1541-1547
- Brann DW, Mahesh VB 1997 Excitatory amino acids: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. *Endocr Rev* 18:678-700
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH 1991 Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7:615-624
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH 1990 Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347:768-770
- Bredt DS, Snyder SH 1989 Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9030-9033
- Bredt DS, Snyder SH 1990 Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:682-685
- Brightman MW, Reese TS 1969 Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40:648-677
- Bruder JM, Spaulding AJ, Wierman ME 1996 Phorbol ester inhibition of rat gonadotropin-releasing hormone promoter activity: role of Fos and Jun in the repression of transcription. *Mol Endocrinol* 10:35-44

- Buchanan C, Malesh V, Zamorano P, Brann D 1998 Central nervous system effects of leptin. *TEM* 4:146-150
- Calogero AE, Burrello N, Ossino AM, Polosa P, D'Agata R 1998 Activin-A stimulates hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release by the explanted male rat hypothalamus: interaction with inhibin and androgens. *J Endocrinol* 156:269-274
- Calogero AE, Burrello N, Ossino AM, Weber RF, D'Agata R 1996 Interaction between prolactin and catecholamines on hypothalamic GnRH release in vitro. *J Endocrinol* 151:269-275
- Calogero AE, Weber RF, Raiti F, Burrello N, Moncada ML, Mongioi A, D'Agata R 1994 Involvement of corticotropin-releasing hormone and endogenous opioid peptides in prolactin-suppressed gonadotropin-releasing hormone release in vitro. *Neuroendocrinology* 60:291-296
- Cameron VA, Nishimura E, Mathews LS, Lewis KA, Sawchenko PE, Vale WW 1994 Hybridization histochemical localization of activin receptor subtypes in rat brain, pituitary, ovary, and testis. *Endocrinology* 134:799-808
- Canteros G, Rettori V, Genaro A, Suburo A, Gimeno M, McCann SM 1996 Nitric oxide synthase content of hypothalamic explants: increase by norepinephrine and inactivated by NO and cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4246-4250
- Caraty A, Locatelli A, Martin GB 1989 Biphasic response in the secretion of gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with oestradiol. *J Endocrinol*, 123(3):375-382
- Ceccatelli S, Lundberg JM, Fahrenkrug J, Bredt DS, Snyder SH, Hokfelt T 1992 Evidence for involvement of nitric oxide in the regulation of hypothalamic portal blood flow. *Neuroscience* 51:769-772
- Chauvet N, Prieto M, Alonso G 1998 Tanycytes present in the adult rat mediobasal hypothalamus support the regeneration of monoaminergic axons. *Exp Neurol* 151:1-13
- Chauvet N, Privat A, Alonso G 1996 Aged median eminence glial cell cultures promote survival and neurite outgrowth of cocultured neurons. *Glia* 18:211-223
- Chen A, Yahalom D, Ben-Aroya N, Kaganovsky E, Okon E, Koch Y 1998 A second isoform of gonadotropin-releasing hormone is present in the brain of human and rodents. *FEBS Lett* 435:199-203

- Chen WP, Witkin JW, Silverman AJ 1990 Sexual dimorphism in the synaptic input to gonadotropin releasing hormone neurons. *Endocrinology* 126:695-702
- Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW 1999 Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 103:401-406
- Ching M 1982 Correlative surges of LHRH, LH and FSH in pituitary stalk plasma and systemic plasma of rat during proestrus. Effect of anesthetics. *Neuroendocrinology*, 34:279-285
- Choi ME, Ballermann BJ Inhibition of capillary morphogenesis and associated apoptosis by dominant negative mutant transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* 1995 270:21144-21150
- Chongthammakun S, Terasawa E 1993 Negative feedback effects of estrogen on luteinizing hormone-releasing hormone release occur in pubertal, but not prepubertal, ovariectomized female rhesus monkeys. *Endocrinology* 132:735-743
- Chowen JA, Argente J, Vician L, Clifton DK, Steiner RA 1990 Pro-opiomelanocortin messenger RNA in hypothalamic neurons is increased by testosterone through aromatization to estradiol. *Neuroendocrinology* 52:581-588
- Chua CC, Diglio CA, Siu BB, Chua BH 1994 Angiotensin II induces TGF-beta 1 production in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1223:141-147
- Clarke IJ 1993 Variable patterns of gonadotropin-releasing hormone secretion during the estrogen-induced luteinizing hormone surge in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 133:1624-1632
- Clarke IJ, Cummins JT 1985 Increased gonadotropin-releasing hormone pulse frequency associated with estrogen-induced luteinizing hormone surges in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 116:2376-2383
- Clifton DK, Sawyer CH 1979 LH release and ovulation in the rat following depletion of hypothalamic norepinephrine: chronic vs. acute effects. *Neuroendocrinology* 28:442-449
- Coen CW, Coombs MC 1983 Effects of manipulating catecholamines on the incidence of the preovulatory surge of luteinizing hormone and ovulation in the rat: evidence for a necessary involvement of hypothalamic adrenaline in the normal or 'midnight' surge. *Neuroscience* 10:187-206



- Coen CW, Montagnese C, Opacka-Juffry J 1990 Coexistence of gonadotropin-releasing hormone and galanin: immunohistochemical and functional studies. *J Neuroendocrinol* 2:107-111
- Cooper KJ, Fawcett CP, McCann SM 1974 Variations in pituitary responsiveness to a luteinizing hormone-follicle stimulating hormone releasing factor (LH-RF-FSH-RF) preparation during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 95:1293-1299
- Costa A, Trainer P, Besser M, Grossman A 1993 Nitric oxide modulates the release of corticotropin-releasing hormone from the rat hypothalamus in vitro. *Brain Res* 605:187-192
- Crowley WR, Kalra SP 1987 Neuropeptide Y stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from medial basal hypothalamus in vitro: modulation by ovarian hormones. *Neuroendocrinology* 46:97-103
- Currie WD, Steele GL, Yuen BH, Kordon C, Gautron JP, Leung PC 1992 Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)- and (hydroxyproline<sup>9</sup>)LHRH-stimulated human chorionic gonadotropin secretion from perfused first trimester placental cells. *Endocrinology*, 130:2871-2816
- Dahl D, Rueger DC, Bignami A, Weber K, Osborn M 1981 Vimentin, the 57 000 molecular weight protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeletal component in immature glia. *Eur J Cell Biol* 24:191-196
- Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH 1994 Molecular mechanisms of nitric oxide actions in the brain. *Ann N Y Acad Sci* 738:76-85
- Dawson TM, Snyder SH 1994 Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14:5147-5159
- De Paolo LV 1985 Differential regulation of pulsatile luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone secretion in ovariectomized rats disclosed by treatment with a LH-releasing hormone antagonist and phenobarbital. *Endocrinology*, 117(5):1826-1833
- Delafontaine P, Bernstein KE, Alexander RW 1991 Insulin-like growth factor I gene expression in vascular cells. *Hypertension* 17:693-699
- Demling J, Fuchs E, Baumert M, Wuttke W 1985 Preoptic catecholamine, GABA, and glutamate release in ovariectomized and ovariectomized estrogen-primed rats utilizing a push-pull cannula technique. *Neuroendocrinology* 41:212-218

- DePaolo LV, King RA, Carrillo AJ 1987 In vivo and in vitro examination of an autoregulatory mechanism for luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 120:272-279
- Deutsch DG, Goligorsky MS, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Das SK, Dey SK, Arreaza G, Thorup C, Stefano G, Moore LC 1997 Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *J Clin Invest* 100:1538-1546
- Diano S, Naftolin F, Horvath TL 1998 Kainate glutamate receptors (GluR5-7) in the rat arcuate nucleus: relationship to tanycytes, astrocytes, neurons and gonadal steroid receptors. *J Neuroendocrinol* 10:239-247
- Dluzen DE, Ramirez VD 1987 In vivo activity of the LHRH pulse generator as determined with push-pull perfusion of the anterior pituitary gland of unrestrained intact and castrate male rats. *Neuroendocrinology*, 45:328-332
- Donoso AO, Lopez FJ, Negro-Vilar 1990 Glutamate receptors of the non-N-methyl-D-aspartic acid type mediate the increase in luteinizing hormone-releasing hormone release by excitatory amino acids in vitro. *Endocrinology* 126:414-420
- Drouva SV, Epelbaum J, Hery M, Tapia-Arancibia L, Laplante E, Kordon C 1981 Ionic channels involved in the LHRH and SRIF release from rat mediobasal hypothalamus. *Neuroendocrinology* 32:155-162
- Drouva SV, Laplante E, Gautron JP, Kordon C 1984 Effects of 17 beta-estradiol on LH-RH release from rat mediobasal hypothalamic slices. *Neuroendocrinology* 38:152-157
- Drouva SV, Laplante E, Kordon C 1982 alpha 1-adrenergic receptor involvement in the LH surge in ovariectomized estrogen-primed rats. *Eur J Pharmacol* 81:341-344
- Drouva SV, Laplante E, Kordon C 1983 Effects of ovarian steroids on in vitro release of LHRH from mediobasal hypothalamus. *Neuroendocrinology* 37:336-341
- Drouva SV, Laplante E, Kordon C 1985 Progesterone-induced LHRH release in vitro is an estrogen--as well as  $Ca^{++}$ - and calmodulin-dependent secretory process. *Neuroendocrinology* 40:325-331
- Dutriez I, Lagny-Pourmir I, Epelbaum J, Beauvillain JC 1997 Ultrastructural localization of galanin and galanin receptors in the guinea pig median eminence. *Brain Res* 753:36-46
- Eipper BA, Mains RE 1980 Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin/endorphin and related peptides. *Endocr Rev* 1:1-27

- Eskay RL, Warberg J, Mical RS, Porter JC 1975 Prostaglandin E<sub>2</sub>-induced release of LHRH into hypophysial portal blood(1). *Endocrinology* 97:816-824
- Evans NP, Dahl GE, Mauger D, Karsch FJ 1995 Estradiol induces both qualitative and quantitative changes in the pattern of gonadotropin-releasing hormone secretion during the presurge period in the ewe. *Endocrinology* 136:1603-1609
- Evans NP, Dahl GE, Padmanabhan V, Thrun LA, Karsch FJ 1997 Estradiol requirements for induction and maintenance of the gonadotropin-releasing hormone surge: implications for neuroendocrine processing of the estradiol signal. *Endocrinology* 138:5408-5414
- Evans NP, McNeilly JR, Webb R 1994 Alterations in endogenous gonadotropin secretion and pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone in adult ewes, following indirect selection in prepubertal male lambs. *Biol Reprod* 51:913-919
- Everitt BJ, Meister B, Hokfelt T, Melander T, Terenius L, Rokaeus A, Theodorsson-Norheim E, Dockray G, Edwardson J, Cuello C, et al 1986 The hypothalamic arcuate nucleus-median eminence complex: immunohistochemistry of transmitters, peptides and DARPP-32 with special reference to coexistence in dopamine neurons. *Brain Res* 396:97-155
- Eyigor O, Jennes L 1997 Expression of glutamate receptor subunit mRNAs in gonadotropin-releasing hormone neurons during the sexual maturation of the female rat. *Neuroendocrinology* 66:122-129
- Falck B, Hillarp NA, Thieme G, Thorp A 1962 Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J Histochem Cytochem* 10:348-354
- Falck B, Owman C 1965 A detailed methodological description of the fluorescence method for the cellular demonstration of biogenic monoamines. *Acta Univ. Lund., Sectio II, No 7*
- Feleder C, Jarry H, Leonhardt S, Moguilevsky JA, Wuttke W 1996 Evidence to suggest that gonadotropin-releasing hormone inhibits its own secretion by affecting hypothalamic amino acid neurotransmitter release. *Neuroendocrinology* 64:298-304
- Fernandez-Galaz MC, Morschl E, Chowen JA, Torres-Aleman I, Naftolin F, Garcia-Segura LM 1997 Role of astroglia and insulin-like growth factor-I in gonadal hormone-dependent synaptic plasticity. *Brain Res Bull* 44:525-531
- Ferris CF, Pan JX, Singer EA, Boyd ND, Carraway RE, Leeman SE 1984 Stimulation of luteinizing hormone release after stereotaxic microinjection of neurotensin into the medial preoptic area of rats. *Neuroendocrinology* 38:145-151

- Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL 1985 Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 313:310-313
- Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL 1985 Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 313:310-313
- Fink G 1995 The self-priming effect of LHRH: a unique servomechanism and possible cellular model for memory. *Front Neuroendocrinol* 16:183-190
- Fink G, Aiyer MS 1974 Gonadotrophin secretion after electrical stimulation of the preoptic area during the oestrous cycle of the rat. *J Endocrinol*, 62:589-604
- Fink G, Jamieson MG 1976 Immunoreactive luteinizing hormone releasing factor in rat pituitary stalk blood: effects of electrical stimulation of the medial preoptic area. *J Endocrinol*, 68:71-87
- Fink G, Sarkar DK, Chiappa SA 1977 Gonadotrophin releasing hormone surge during pro-oestrus: role of steroid hormones [proceedings] *J Endocrinol*, 75:47P-48P
- Finley JC, Lindstrom P, Petrusz 1981 P Immunocytochemical localization of beta-endorphin-containing neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology* 33:28-42
- Finn PD, Steiner RA, Clifton DK 1998 Temporal patterns of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), c-fos, and galanin gene expression in GnRH neurons relative to the luteinizing hormone surge in the rat. *J Neurosci* 18:713-719
- Flugge G, Oertel WH, Wuttke W 1986 Evidence for estrogen-receptive GABAergic neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area of the rat brain. *Neuroendocrinology* 43:1-5
- Forstermann U, Kleinert H 1995 Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352:351-364
- Fuxe K, Agnati LF, Benfenati F, Andersson K, Camurri M, Zoli M 1983 Evidence for the existence of a dopamine receptor of the D-1 type in the rat median eminence. *Neurosci Lett* 43:185-190
- Gagelin C, Pierre M, Gavaret JM, Toru-Delbauffe D 1995 Rapid TGF beta 1 effects on actin cytoskeleton of astrocytes: comparison with other factors and implications for cell motility. *Glia* 13:283-293
- Galbiati M, Zanisi M, Messi E, Cavarretta I, Martini L, Melcangi RC 1996 Transforming growth factor-beta and astrocytic conditioned medium influence luteinizing hormone-

- releasing hormone gene expression in the hypothalamic cell line GT1. *Endocrinology* 137:5605-5609
- Gallo F, Morale MC, Avola R, Marchetti B, 1995 Cross-talk between luteinizing hormone-releasing-hormone (LHRH) neurons and astroglial cells : developing glia release factors that accelerate neuronal differentiation and stimulate LHRH release from GT<sub>1-1</sub> neuronal cell line and LHRH neurons induce astroglia proliferation. *Endocr J* 3:863-874
- Gambacciani M, Yen SS, Rasmussen DD 1986 GnRH release from the mediobasal hypothalamus: in vitro inhibition by corticotropin-releasing factor. *Neuroendocrinology* 43:533-536
- Garcia-Segura LM, Chowen JA, Parducz A, Naftolin F 1994 Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol* 44:279-307
- Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B 1995 Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* 48:184-188
- Gautron JP, Leblanc P, Bluet-Pajot MT, Pattou E, L'Héritier A, Mounier F, Ponce G, Audinot V, Rasolonjanahary R, Kordon C 1992 A second endogenous molecular form of mammalian hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH), (hydroxyproline<sup>9</sup>)LHRH, releases luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in vitro and in vivo. *Mol Cell Endocrinol*, 85:99-107
- Gautron JP, Pattou E, Bauer K, Kordon C 1991 (Hydroxyproline<sup>9</sup>) luteinizing hormone releasing hormone : a novel peptide in mammalian and frog hypothalamus. *Neurochem Int* 18:221-235
- Gautron JP, Pattou E, Leblanc P, L'Heritier A, Kordon C 1993 Preferential distribution of C-terminal fragments of [hydroxyproline<sup>9</sup>]LHRH in the rat hippocampus and olfactory bulb. *Neuroendocrinology* 58:240-250
- Geiger R, König W, Wissmann H, Geisen K, Enzmann F 1971 Synthesis and characterisation of a decapeptide having LH-RH-FSH-RH activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 45:767-773

- Gibson MJ, Ingraham L, Dobrjansky A 1998 Is the soluble attractant for GnRH axonal pathfinding to the median eminence derived from endothelial cells? Soc Neurisci Abst 315.5
- Gillies GE, Linton EA, Lowry PJ 1982 Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature* 299:355-357
- Giordana MT, Migheli A, Mocellini C, Villare F, Schiffer D 1992 Immunohistochemical observations on rat radial glia: relationship with the origin of ethylnitrosourea-induced tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 84:387-393
- Gonzalez AM, Logan A, Ying W, Lappi DA, Berry M, Baird A 1994 Fibroblast growth factor in the hypothalamic-pituitary axis: differential expression of fibroblast growth factor-2 and a high affinity receptor. *Endocrinology* 134:2289-2297
- Gonzalez-Manchon C, Bilezikjian LM, Corrigan AZ, Mellon PL, Vale W 1991 Activin-A modulates gonadotropin-releasing hormone secretion from gonadotropin-releasing hormone-secreting neuronal cell line. *Neuroendocrinology* 54:373-377
- Gordon JH, Reichlin S 1974 Changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing factor during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 94:974-978
- Gore AC, Roberts JL 1995 Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat during the luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 136:889-896
- Grossman A 1994 NO news is good news. *Endocrinology* 134:1003-1005
- Hagg T, Portera-Cailliau C, Jucker M, Engvall E 1997 Laminins of the adult mammalian CNS; laminin-alpha2 (merosin M-) chain immunoreactivity is associated with neuronal processes. *Brain Res* 764:17-27
- Hannan RL, Kourembanas S, Flanders KC, Rogelj SJ, Roberts AB, Faller DV, Klagsbrun M 1988 Endothelial cells synthesize basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. *Growth Factors* 1:7-17
- Harris GW 1972 Humours and hormones. *J Endocrinol* 53:ii-xiii
- Hayashi T, Yamada K, Esaki T, Kuzuya M, Satake S, Ishikawa T, Hidaka H, Iguchi A 1995 Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. *Biochem Biophys Res Commun* 214:847-855
- He JR, Molnar J, Barraclough CA 1993 Morphine amplifies norepinephrine (NE)-induced LH release but blocks NE-stimulated increases in LHRH mRNA levels: comparison of

- responses obtained in ovariectomized, estrogen-treated normal and androgen-sterilized rats. *Brain Res Mol Brain Res* 20:71-78
- Herbison AE 1997 Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. *Rev Reprod* 2:1-6
- Herbison AE 1997b Estrogen regulation of GABA transmission in rat preoptic area. *Brain Res Bull* 44:321-326
- Herbison AE 1998 Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19:302-330
- Herbison AE, Chapman C, Dyer RG 1991 Role of medial preoptic GABA neurones in regulating luteinising hormone secretion in the ovariectomised rat. *Exp Brain Res* 87:345-352
- Herbison AE, Fenelon VS 1995 Estrogen regulation of GABAA receptor subunit mRNA expression in preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis of female rat brain. *J Neurosci* 15:2328-2337
- Herbison AE, Horvath TL, Naftolin F, Leranath C 1995 Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in monkey hypothalamus: relationship to neurones containing luteinizing hormone-releasing hormone and tyrosine hydroxylase. *Neuroendocrinology* 61:1-10
- Herbison AE, Robinson JE, Skinner DC 1993 Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the preoptic area of the ewe: co-localization with glutamic acid decarboxylase but not luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 57:751-759
- Herbison AE, Simonian SX, Norris PJ, Emson PC 1996 Relationship of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat. *J Neuroendocrinol* 8:73-82
- Herbison AE, Theodosis DT 1992 Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. *Neuroscience* 50:283-298
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC 1991 Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11:563-583

- Hindley S, Juurlink BH, Gysbers JW, Middlemiss PJ, Herman MA, Rathbone MP 1997 Nitric oxide donors enhance neurotrophin-induced neurite outgrowth through a cGMP-dependent mechanism. *J Neurosci Res* 47:427-439
- Hiney JK, Ojeda SR, Dees WL 1991 Insulin-like growth factor I: a possible metabolic signal involved in the regulation of female puberty. *Neuroendocrinology* 54:420-423
- Hisano S, Ishizuka H, Nishiyama T, Tsuruo Y, Katoh S, Daikoku S 1986 Immunoelectron microscopic observations of hypothalamic TRH-containing neurons in rats. *Exp Brain Res* 63:495-504.
- Hoffman GE, Gibbs FP 1982 LHRH pathways in rat brain: 'deafferentation' spares a sub-chiasmatic LHRH projection to the median eminence. *Neuroscience*, 7:1979-1993
- Hofman FM, Chen P, Jeyaseelan R, Incardona F, Fisher M, Zidovetzki R 1998 Endothelin-1 induces production of the neutrophil chemotactic factor interleukin-8 by human brain-derived endothelial cells. *Blood* 92:3064-3072
- Hökfelt T, Elde R, Fuxe K, Johanson O, Ake Ljungdahl, Goldstein M, Luft R, Efendic S, Nilsson G, Terenius L, Ganten D, Jeffcoate SL, Rehfeld J, Said S, Perez de la Mora M, Possani L, Tapia R, Teran L, Palacios R 1978 Aminergic and peptidergic pathways in the nervous system with special reference to the hypothalamus. *The hypothalamus* Raven Press, New York 69-135
- Honma K, Wuttke W 1980 Norepinephrine and dopamine turnover rates in the medial preoptic area and the mediobasal hypothalamus of the rat brain after various endocrinological manipulations. *Endocrinology* 106:1848-1853
- Horvath TL, Naftolin F, Leranth C 1992 GABAergic and catecholaminergic innervation of mediobasal hypothalamic beta-endorphin cells projecting to the medial preoptic area. *Neuroscience* 51:391-399
- Hosny S, Jennes L 1998 Identification of alpha1B adrenergic receptor protein in gonadotropin releasing hormone neurones of the female rat. *J Neuroendocrinol* 10:687-692
- Huang X, Harlan RE 1993 Absence of androgen receptors in LHRH immunoreactive neurons. *Brain Res* 624:309-311
- Ibata Y, Okamura H, Makino S, Kawakami F, Morimoto N, Chihara K (1986) Light and electron microscopic immunocytochemistry of GRF-like immunoreactive neurons and



- terminals in the rat hypothalamic arcuate nucleus and median eminence. *Brain Res* 370:136-143.
- Imura H, Kato Y, Nakai Y, Nakao K, Tanaka I, Jingami H, Koh T, Yoshimasa T, Tsukada T, Suda M, et al 1985 Endogenous opioids and related peptides: from molecular biology to clinical medicine. The Sir Henry Dale lecture for 1985. *J Endocrinol* 107:147-157
- Jakeman L, Mather J, Woodruff T 1992 In vitro ligand binding of 125I-recombinant human activin A to the female rat brain. *Endocrinology* 131:3117-3119
- Jarjour LT, Handelsman DJ, Raum WJ, Swerdloff RS 1986 Mechanism of action of dopamine on the in vitro release of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 119:1726-1732
- Jarry H, Leonhardt S, Wuttke W 1991 Gamma-aminobutyric acid neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area synchronize the phasic activity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 53:261-267
- Jennes L, Stumpf WE 1980 LHRH-systems in the brain of the golden hamster. *Cell Tissue Res*, 209(2):239-356
- Jennes L, Stumpf WE 1986 Gonadotropin-releasing hormone immunoreactive neurons with access to fenestrated capillaries in mouse brain. *Neuroscience*, 18:403-416
- Jew JY, Leranth C, Arimura A, Palkovits M 1984 Preoptic LH-RH and somatostatin in the rat median eminence. An experimental light and electron microscopic immunocytochemical study. *Neuroendocrinology* 38:169-175.
- Jung H, Shannon EM, Fritschy JM, Ojeda SR 1998 Several GABAA receptor subunits are expressed in LHRH neurons of juvenile female rats. *Brain Res* 780:218-229
- Junier MP, Ma YJ, Costa ME, Hoffman G, Hill DF, Ojeda SR 1991 Transforming growth factor alpha contributes to the mechanism by which hypothalamic injury induces precocious puberty. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9743-9747
- Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin WW 1993 Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in vivo and in vitro. *Endocrinology* 133:931-934
- Kalra SP 1981 Neural loci involved in naloxone-induced luteinizing hormone release: effects of a norepinephrine synthesis inhibitor. *Endocrinology* 109:1805-1810

- Kalra SP 1993 Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocr Rev* 14:507-538
- Kalra SP 1993 Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocr Rev* 14:507-538
- Kalra SP, Fuentes M, Fournier A, Parker SL, Crowley WR 1992 Involvement of the Y-1 receptor subtype in the regulation of luteinizing hormone secretion by neuropeptide Y in rats. *Endocrinology* 130:3323-3330
- Kalra SP, Horvath T, Naftolin F, Xu B, Pu S, Kalra PS 1997 The interactive language of the hypothalamus for the gonadotropin releasing hormone (GnRH) system. *J Neuroendocrinol* 9:569-576
- Kalra SP, Kalra PS 1974 Temporal interrelationships among circulating levels of estradiol, progesterone and LH during the rat estrous cycle: effects of exogenous progesterone. *Endocrinology* 95:1711-1718
- Kalra SP, Kalra PS 1989 Do testosterone and estradiol-17 beta enforce inhibition or stimulation of luteinizing hormone-releasing hormone secretion? *Biol Reprod* 41:559-570
- Kang SH, Seong JY, Cho S, Cho H, Kim K 1995 Acute increase of GABAergic neurotransmission exerts a stimulatory effect on GnRH gene expression in the preoptic/anterior hypothalamic area of ovariectomized, estrogen- and progesterone-treated adult female rats. *Neuroendocrinology* 61:486-492
- Karanth S, Lyson K, McCann SM 1993 Role of nitric oxide in interleukin 2-induced corticotropin-releasing factor release from incubated hypothalami. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3383-3387
- Katayama ML, Federico MH, Brentani RR, Brentani MM 1998 Eosinophil accumulation in rat uterus following estradiol administration is modulated by laminin and its integrin receptors. *Cell Adhes Commun* 5:409-424
- Kawakami SI, Hirunagi K, Ichikawa M, Tsukamura H, Maeda KI 1998 Evidence for terminal regulation of GnRH release by excitatory amino acids in the median eminence in female rats: a dual immunoelectron microscopic study. *Endocrinology* 139:1458-1461
- Kawakami Si, Ichikawa M, Murahashi K, Hirunagi K, Tsukamura H, Maeda Ki 1998b Excitatory amino acids act on the median eminence nerve terminals to induce

- gonadotropin-releasing hormone release in female rats. *Gen Comp Endocrinol* 112:372-382
- Kawano H, Daikoku S 1981 Immunohistochemical demonstration of LHRH neurons and their pathways in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 32:179-186
- Ke FC, Ramirez VD 1987 Membrane mechanism mediates progesterone stimulatory effect on LHRH release from superfused rat hypothalamus in vitro. *Neuroendocrinology* 45:514-517
- Kerdelhue B, Parnet P, Lenoir V, Schirar A, Gaudoux F, Levasseur MC, Palkovits M, Blacker C, Scholler R 1988 Interactions between 17 beta-estradiol and the hypothalamo-pituitary beta-endorphin system in the regulation of the cyclic LH secretion. *J Steroid Biochem* 30:161-168
- Kerdelhue B, Valens M, Langlois Y 1978 Stimulation de la sécrétion de la LH et de la FSH hypophysaires après immunoneutralisation de la substance P endogène, chez la rate cyclique. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 286:977-979
- Khorrarn O, Pau KY, Spies HG 1988 Release of hypothalamic neuropeptide Y and effects of exogenous NPY on the release of hypothalamic GnRH and pituitary gonadotropins in intact and ovariectomized does in vitro. *Peptides* 9:411-417
- Kim K, Ramirez VD 1982 In vitro progesterone stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from superfused hypothalamic tissue from ovariectomized estradiol-primed prepuberal rats. *Endocrinology* 111:750-757
- Kim K, Ramirez VD 1985 In vitro luteinizing hormone-releasing hormone release from superfused rat hypothalamus: site of action of progesterone and effect of estrogen priming. *Endocrinology* 116:252-258
- Kim K, Ramirez VD 1986 In vitro LHRH release from superfused hypothalamus as a function of the rat estrous cycle: effect of progesterone. *Neuroendocrinology* 42:392-398
- King JA, Steneveld AA, Curlewis JD, Rissman EF, Millar RP 1994 Identification of chicken GnRH II in brains of metatherian and early-evolved eutherian species of mammals. *Regul Pept* 54:467-477
- King JC, Letourneau R J 1994 Luteinizing hormone-releasing hormone terminals in the median eminence of rats undergo dramatic changes after gonadectomy, as revealed by electron microscopic image analysis. *Endocrinology* 134:1340-1351.

- King JC, Ronsheim PM, Rubin BS 1996 Plastic changes in LHRH terminals, glia and portal capillaries of the median eminence as a function of ovariectomy. *Soc Neurosci Abst* 22:959
- King JC, Rubin BS 1995 Dynamic alterations in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neuronal cell bodies and terminals of adult rats. *Cell Mol Neurobiol* 15:89-106
- King JC, Tai DW, Hanna IK, Pfeiffer A, Haas P, Ronsheim PM, Mitchell SC, Turcotte JC, Blaustein JD 1995 A subgroup of LHRH neurons in guinea pigs with progesterin receptors is centrally positioned within the total population of LHRH neurons. *Neuroendocrinology* 61:265-275
- King JC, Tobet SA, Snavely FL, Arimura AA 1982 LHRH immunopositive cells and their projections to the median eminence and organum vasculosum of the lamina terminalis. *J Comp Neurol*, 209(3):287-300
- Kiss JZ, Mezey E, Cassell MD, Williams TH, Mueller GP, O'Donohue TL, Palkovits M 1985 Topographical distribution of pro-opiomelanocortin-derived peptides (ACTH/beta-END/alpha-MSH) in the rat median eminence. *Brain Res* 329:169-176
- Knigge KM 1980 Relationship of intracerebral pituitary grafts to central neuropeptide systems. *Am J Anat*, 158(4):549-563
- Koslowski GP, Coates PW 1985 Ependymoneural specialisation between LHRH fibers and cells of the cerebroventricular system. *Cell Tissue Res* 242:301-311.
- Krohn K, Laping NJ, Morgan TE, Finch CE 1995 Expression of vimentin increases in the hippocampus and cerebral cortex after entorhinal cortex lesioning and in response to transforming growth factor beta 1. *J Neuroimmunol* 56:53-63
- Krsmanovic LZ, Stojilkovic SS, Merelli F, Dufour SM, Virmani MA, Catt KJ 1992 Calcium signaling and episodic secretion of gonadotropin-releasing hormone in hypothalamic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8462-8466
- Krsmanovic LZ, Virmani MA, Stojilkovic SS, Catt KJ 1994 Stimulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by acetyl-L-carnitine in hypothalamic neurons and GT1 neuronal cells. *Neurosci Lett* 165:33-36
- Krzywkowski P, Lagny-Pourmir I, Jazat F, Lamour Y, Epelbaum J 1993 Age-related increase in galanin-binding sites in the rat brain: correlation with behavioral impairment. *Ann N Y Acad Sci* 695:249-653

- Lagny-Pourmir I, Epelbaum J 1992 Regional stimulatory and inhibitory effects of guanine nucleotides on [125I]galanin binding in rat brain: relationship with the rate of occupancy of galanin receptors by endogenous galanin. *Neuroscience* 49:829-847
- Lagrange AH, Ronnekleiv OK, Kelly MJ 1995 Estradiol-17 beta and mu-opioid peptides rapidly hyperpolarize GnRH neurons: a cellular mechanism of negative feedback? *Endocrinology* 136:2341-2344
- Langub MC Jr, Watson RE Jr 1992 Estrogen receptor-immunoreactive glia, endothelia, and ependyma in guinea pig preoptic area and median eminence: electron microscopy. *Endocrinology* 130:364-372
- Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, Shaul PW 1997 Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* 273:L119-126
- Laping NJ, Morgan TE, Nichols NR, Rozovsky I, Young-Chan CS, Zarow C, Finch CE 1994 Transforming growth factor-beta 1 induces neuronal and astrocyte genes: tubulin alpha 1, glial fibrillary acidic protein and clusterin. *Neuroscience* 58:563-572
- Leadem CA, Crowley WR, Simpkins JW, Kalra SP 1985 Effects of naloxone on catecholamine and LHRH release from the perfused hypothalamus of the steroid-primed rat. *Neuroendocrinology* 40:497-500
- Leadem CA, Kalra SP 1984 Stimulation with estrogen and progesterone of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone release from perfused adult female rat hypothalami: correlation with the LH surge. *Endocrinology* 114:51-56
- Leadem CA, Kalra SP 1985 Effects of endogenous opioid peptides and opiates on luteinizing hormone and prolactin secretion in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 41:342-352
- Leadem CA, Yagenova SV 1987 Effects of specific activation of mu-, delta- and kappa-opioid receptors on the secretion of luteinizing hormone and prolactin in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 45:109-117
- Lee S, Rivier C 1997 Effect of repeated activin-A treatment on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of the adult male rat. *Biol Reprod* 56:969-975
- Lee WS, Abbud R, Hoffman GE, Smith MS 1993 Effects of N-methyl-D-aspartate receptor activation on cFos expression in luteinizing hormone-releasing hormone neurons in female rats. *Endocrinology* 133:2248-2254

- Lee WS, Smith MS, Hoffman GE 1990 Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express Fos protein during the proestrous surge of luteinizing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5163-5167
- Lefrancois T, Fages C, Peschanski M, Tardy M 1997 Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA in injured neuron-astrocyte cocultures. *J Neurosci* 17:4121-4128
- Lehman MN, Karsch FJ 1993 Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and beta-endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. *Endocrinology* 133:887-895
- Lehman MN, Karsch FJ, Robinson JE, Silverman AJ 1988 Ultrastructure and synaptic organization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in the anestrous ewe. *J Comp Neurol* 273:447-458
- Lengyel AM, Grossman A, Bouloux PM, Rees LH, Besser GM 1985 Effects of dopamine and morphine on immunoreactive somatostatin and LH-releasing hormone secretion from hypothalamic fragments in vitro. *J Endocrinol* 106:317-322
- Leonardelli J, Barry J, Dubois MP 1973 Demonstration by fluorescent antibody technic of a substance immunologically related to LH-RF in hypothalamus and median eminence in mammals *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 276:2043-2046
- Leonardelli J, Poulain P 1977 About a ventral LH-RH preoptico-amygdaloid pathway in the guinea pig. *Brain Res*, 124:538-543
- Leonhardt S, Seong JY, Kim K, Thorun Y, Wuttke W, Jarry H 1995 Activation of central GABAA-but not of GABAB-receptors rapidly reduces pituitary LH release and GnRH gene expression in the preoptic/anterior hypothalamic area of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 61:655-662
- Leranth C, MacLusky NJ, Sakamoto H, Shanabrough M, Naftolin F 1985 Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial preoptic area. *Neuroendocrinology* 40:536-539
- Leranth C, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F 1988 Immunohistochemical evidence for synaptic connections between pro-opiomelanocortin-immunoreactive axons and LH-RH neurons in the preoptic area of the rat. *Brain Res* 449:167-176

- Lescheid DW, Terasawa E, Abler LA, Urbanski HF, Warby CM, Millar RP, Sherwood NM 1997 A second form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) with characteristics of chicken GnRH-II is present in the primate brain. *Endocrinology*, 138:5618-5629
- Levine JE 1997 New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats. *Biol Reprod* 56:293-302
- Levine JE, Duffy MT 1988 Simultaneous measurement of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone, LH, and follicle-stimulating hormone release in intact and short-term castrate rats. *Endocrinology*, 122:2211-2221
- Levine JE, Norman RL, Gliessman PM, Oyama TT, Bangsberg DR, Spies HG 1985 In vivo gonadotropin-releasing hormone release and serum luteinizing hormone measurements in ovariectomized, estrogen-treated rhesus macaques. *Endocrinology*, 117:711-721
- Levine JE, Ramirez VD 1982 Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy, as estimated with push-pull cannulae. *Endocrinology*, 111:1439-1448
- Li Q, Tamarkin L, Levantine P, Ottinger MA 1994 Estradiol and androgen modulate chicken luteinizing hormone-releasing hormone-I release in vitro. *Biol Reprod* 51:896-903
- Li S, Hong M, Fournier A, St-Pierre S, Pelletier G 1994 Role of neuropeptide Y in the regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat preoptic area. *Brain Res Mol Brain Res* 26:69-73
- Liaw J, Barraclough CA 1993 N-Methyl-D,L-aspartic acid differentially affects LH release and LHRH mRNA levels in estrogen-treated ovariectomized control and androgen-sterilized rats. *Mol Brain Res* 17:112-118
- Lin HY, Wang XF 1992 Expression cloning of TGF-beta receptors. *Mol Reprod Dev* 32:105-110
- Linton EA, Bennett GW, 1979 Whitehead SA Prostaglandins and the release of LHRH from hypothalamic synaptosomes. Effects of indomethacin pretreatment. *Neuroendocrinology* 28:394-401
- Liposits Z, Gorcs T, Setalo G, Lengvari I, Flerko B, Vigh S, Schally AV 1983 Ultrastructural characteristics of immunolabelled, corticotropin releasing factor (CRF)-synthesizing neurons in the rat brain. *Cell Tissue Res* 229:191-196.

- Liposits Z, Reid JJ, Negro-Vilar A, Merchenthaler I 1995 Sexual dimorphism in copackaging of luteinizing hormone-releasing hormone and galanin into neurosecretory vesicles of hypophysiotrophic neurons: estrogen dependency. *Endocrinology* 136:1987-1992
- Liu Y, Shenouda D, Bilfinger TV, Stefano ML, Magazine HI, Stefano GB 1996 Morphine stimulates nitric oxide release from invertebrate microglia. *Brain Res* 722:125-131
- Lopez FJ, Donoso AO, Negro-Vilar A 1990 Endogenous excitatory amino acid neurotransmission regulates the estradiol-induced LH surge in ovariectomized rats. *Endocrinology* 126:1771-1773
- Lopez FJ, Donoso AO, Negro-Vilar A 1992 Endogenous excitatory amino acids and glutamate receptor subtypes involved in the control of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 130:1986-1992
- Lopez FJ, Meade EH Jr, Negro-Vilar A 1993 Endogenous galanin modulates the gonadotropin and prolactin proestrous surges in the rat. *Endocrinology* 132:795-800
- Lopez FJ, Merchenthaler I, Ching M, Wisniewski MG, Negro-Vilar A 1991 Galanin: a hypothalamic-hypophysiotropic hormone modulating reproductive functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4508-4512
- Lopez FJ, Merchenthaler IJ, Moretto M, Negro-Vilar A 1998 Modulating mechanisms of neuroendocrine cell activity: the LHRH pulse generator. *Cell Mol Neurobiol* 18:125-146
- Lopez FJ, Moretto M, Merchenthaler I, Negro-Vilar A 1997 Nitric oxide is involved in the genesis of pulsatile LHRH secretion from immortalized LHRH neurons. *J Neuroendocrinol* 9:647-654
- Lopez FJ, Negro-Vilar A 1990 Galanin stimulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion from arcuate nucleus-median eminence fragments in vitro: involvement of an alpha-adrenergic mechanism. *Endocrinology* 127:2431-2436
- Ma YJ, Berg-von der Emde K, Moholt-Siebert M, Hill DF, Ojeda SR 1994a Region-specific regulation of transforming growth factor alpha (TGF alpha) gene expression in astrocytes of the neuroendocrine brain. *J Neurosci* 14:5644-5651
- Ma YJ, Berg-von der Emde K, Rage F, Wetsel WC, Ojeda SR 1997 Hypothalamic astrocytes respond to transforming growth factor-alpha with the secretion of neuroactive substances that stimulate the release of luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 138:19-25



- Ma YJ, Hill DF, Junier MP, Costa ME, Felder SE, Ojeda SR 1994b Expression of epidermal growth factor receptor changes in the hypothalamus during the onset of female puberty. *Mol Cell Neurosci* 5:246-262
- Ma YJ, Junier MP, Costa ME, Ojeda SR 1992 Transforming growth factor-alpha gene expression in the hypothalamus is developmentally regulated and linked to sexual maturation. *Neuron* 9:657-670
- Madri JA, Pratt BM, Tucker AM 1988 Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor-beta depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. *J Cell Biol* 106:1375-1384
- Mahachoklertwattana P, Sanchez J, Kaplan SL, Grumbach MM 1994 N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors mediate the release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) by NMDA in a hypothalamic GnRH neuronal cell line (GT1-1). *Endocrinology* 134:1023-1030
- Malik KF, Silverman AJ, Morrell JI 1991 Gonadotropin-releasing hormone mRNA in the rat: distribution and neuronal content over the estrous cycle and after castration of males. *Anat Rec* 231:457-466
- Mandriota SJ, Menoud PA, Pepper MS 1996 Transforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelial growth factor receptor 2/flk-1 expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 271:11500-11505
- Mansky T, Mestres-Ventura P, Wuttke W 1982 Involvement of GABA in the feedback action of estradiol on gonadotropin and prolactin release: hypothalamic GABA and catecholamine turnover rates. *Brain Res* 231:353-364
- Marks DL, Lent KL, Rossmanith WG, Clifton DK, Steiner RA 1994 Activation-dependent regulation of galanin gene expression in gonadotropin-releasing hormone neurons in the female rat. *Endocrinology* 134:1991-1998
- Marks DL, Smith MS, Vrontakis M, Clifton DK, Steiner RA 1993 Regulation of galanin gene expression in gonadotropin-releasing hormone neurons during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 132:1836-1844
- Marshall PE, Goldsmith PC 1980 Neuroregulatory and neuroendocrine GnRH pathways in the hypothalamus and forebrain of the baboon. *Brain Res*, 193(2):353-372

- Martinez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI 1992 Beta 1-adrenergic regulation of the GT1 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal cell lines: stimulation of GnRH release via receptors positively coupled to adenylate cyclase. *Endocrinology* 131:1397-1402
- Martinez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI 1992 Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses: intrinsic properties of the GT1-1 GnRH neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1852-1855
- Martinez de la Escalera G, Gallo F, Choi AL, Weiner RI 1992 Dopaminergic regulation of the GT1 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal cell lines: stimulation of GnRH release via D1-receptors positively coupled to adenylate cyclase. *Endocrinology* 131:2965-2971
- Mason AJ, Hayflick JS, Ling N, Esch F, Ueno N, Ying SY, Guillemin R, Niall H, Seeburg PH 1985 Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor-beta. *Nature* 318:659-663
- Masotto C, Negro-Vilar A 1987 Activation of gamma-aminobutyric acid B-receptors abolishes naloxone-stimulated luteinizing hormone release. *Endocrinology* 121:2251-2255
- Masotto C, Wisniewski G, Negro-Vilar A 1989 Different gamma-aminobutyric acid receptor subtypes are involved in the regulation of opiate-dependent and independent luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 125:548-553
- Matsuo H, Arimura A, Nair RM, Schally AV 1971 Synthesis of the porcine LH- and FSH-releasing hormone by the solid-phase method. *Biochem Biophys Res Commun*, 45(3):822-827
- Mattson MP, Barger SW, Furukawa K, Bruce AJ, Wyss-Coray T, Mark RJ, Mucke L 1997 Cellular signaling roles of TGF beta, TNF alpha and beta APP in brain injury responses and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 23:47-61
- McCann SM 1962 A hypothalamic luteinizing hormone factor. *Amer J Physiol* 202:432-434
- McCann SM, Taleisnick S, Friedman HM 1960 LH releasing activity in hypothalamic extracts. *Proc Soc Exp Biol Med* 104:432-434
- McCarthy SA, Bicknell R 1993 Inhibition of vascular endothelial cell growth by activin-A. *J Biol Chem* 268:23066-23071

- McDonald MC, Wilkinson M 1992 Characterization and ontogenesis of N-methyl-D-aspartate-evoked luteinizing hormone secretion in immature female rats. *J Neuroendocrinol* 4:223-229
- McRee RC, Meyer DC 1993 GABA control of LHRH release is dependent on the steroid milieu. *Neurosci Lett* 157:227-230
- Medhamurthy R, Gay VL, Plant TM 1992 Repetitive injections of L-glutamic acid, in contrast to those of N-methyl-D,L-aspartic acid, fail to elicit sustained hypothalamic GnRH release in the prepubertal male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Neuroendocrinology* 55:660-666
- Meister B, Ceccatelli S, Hokfelt T, Anden NE, Anden M, Theodorsson E 1989 Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. *Exp Brain Res* 76:343-368
- Meister B, Hokfelt T, Tsuruo Y, Hemmings H, Ouimet C, Greengard P, Goldstein M 1988 DARPP-32, a dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein in tanycytes of the mediobasal hypothalamus: distribution and relation to dopamine and luteinizing hormone-releasing hormone neurons and other glial elements. *Neuroscience* 27:607-622
- Melander T, Fuxe K, Harfstrand A, Eneroth P, Hokfelt T 1987 Effects of intraventricular injections of galanin on neuroendocrine functions in the male rat. Possible involvement of hypothalamic catecholamine neuronal systems. *Acta Physiol Scand* 131:25-32
- Melander T, Hokfelt T, Rokaeus A 1986 Distribution of galaninlike immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 248:475-517
- Melcangi RC, Galbiati M, Messi E, Piva F, Martini L, Motta M 1995 Type 1 astrocytes influence luteinizing hormone-releasing hormone release from the hypothalamic cell line GT1-1: is transforming growth factor-beta the principle involved? *Endocrinology* 136:679-686
- Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner R 1990 Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5:1-10
- Melrose PA 1987 In vitro evidence for short-loop gonadotropin feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons harvested from adult male rats. *Endocrinology* 121:200-204

- Mendelsohn ME, Karas RH 1994 Estrogen and the blood vessel wall. *Curr Opin Cardiol* 9:619-626
- Merchenthaler I, Görös T, Sétáló G, Petrusz P, Flerko B 1984 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain. *Cell Tissue Res*, 237(1):15-29
- Merchenthaler I, Kovacs G, Lavasz G, Sétáló G 1980 The preoptico-infundibular LH-RH tract of the rat. *Brain Res*, 198:63-74
- Merchenthaler I, Lopez FJ, Lennard DE, Negro-Vilar A 1991 Sexual differences in the distribution of neurons coexpressing galanin and luteinizing hormone-releasing hormone in the rat brain. *Endocrinology* 129:1977-1986
- Merchenthaler I, Lopez FJ, Negro-Vilar A 1990 Colocalization of galanin and luteinizing hormone-releasing hormone in a subset of preoptic hypothalamic neurons: anatomical and functional correlates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6326-6330
- Merchenthaler I, Lopez FJ, Negro-Vilar A 1993 Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways. *Prog Neurobiol* 40:711-769
- Merchenthaler I, Maderdrut JL, Altschuler RA, Petrusz P 1986 Immunocytochemical localization of proenkephalin-derived peptides in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* 17:325-348
- Meunier H, Cajander SB, Roberts VJ, Rivier C, Sawchenko PE, Hsueh AJ, Vale W 1988 Rapid changes in the expression of inhibin alpha-, beta A-, and beta B-subunits in ovarian cell types during the rat estrous cycle. *Mol Endocrinol* 2:1352-1363
- Miller FD, Naus CC, Durand M, Bloom FE, Milner RJ 1987 Isotypes of alpha-tubulin are differentially regulated during neuronal maturation. *J Cell Biol* 105:3065-3073
- Mitchell V, Bouret S, Prevot V, Jennes L, Beauvillain JC 1999 Evidence for expression of galanin receptor Gal-R1 mRNA in certain gonadotropin releasing hormone neurons of the rostral preoptic area. *J Neuroendocrinol* in press
- Mitchell V, Prevot V, Jennes L, Aubert JP, Croix D, Beauvillain JC 1997 Presence of mu and kappa opioid receptor mRNAs in galanin but not in GnRH neurons in the female rat. *Neuroreport* 8:3167-3172
- Mitsushima D, Hei DL, Terasawa E 1994 gamma-Aminobutyric acid is an inhibitory neurotransmitter restricting the release of luteinizing hormone-releasing hormone before the onset of puberty. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:395-399

- Miyahara K, Kawamoto T, Sase K, Yui Y, Toda K, Yang LX, Hattori R, Aoyama T, Yamamoto Y, Doi Y, et al 1994 Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene. *Eur J Biochem* 223:719-726
- Miyake A, Tasaka K, Kawamura Y, Sakumoto T, Aono T 1982 Progesterone facilitates the LRH releasing action of oestrogen. *Acta Endocrinol (Copenh)* 101:321-324
- Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H 1984 Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81:3874-3878
- Moenter SM, Caraty A, Karsch FJ 1990 The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology* 127:1375-1384
- Moenter SM, Caraty A, Locatelli A, Karsch FJ 1991 Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology*, 129(3):1175-1182
- Mohankumar PS, Thyagarajan S, Quadri SK 1994 Correlations of catecholamine release in the medial preoptic area with proestrous surges of luteinizing hormone and prolactin: effects of aging. *Endocrinology* 135:119-126
- Monahan M, Rivier J, Burgus R, Amoss M, Blackwell R, Vale W, Guillemin R 1971 Total synthesis by solid phase of a decapeptide stimulating the secretion of LH and FSH pituitary gonadotropins *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 273:508-510
- Monroe BG 1967 A comparative study of the ultrastructure of the median eminence infundibular STEM and neural lobe of the hypophysis of the rat. *Z Zellforsch* 76:405-432
- Moore WM, Webber RK, Jerome GM, Tjoeng FS, Misko TP, Currie MG 1994 L-N6-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem* 37:3886-8
- Moretto M, Lopez FJ, Negro-Vilar A 1993 Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 133:2399-2402
- Morita N, Takumi T, Kiyama H 1996 Distinct localization of two serine-threonine kinase receptors for activin and TGF-beta in the rat brain and down-regulation of type I activin receptor during peripheral nerve regeneration. *Brain Res Mol Brain Res* 42:263-271

- Naftolin F, Leranth C, Machusky N 1986 Norepinephrine (NE) and dopamine (DA) innervation of medial preoptic area (MPO) LHRH and GABA neurons in the rat. Soc Neurosci Abstr 12:1-152
- Negro-Vilar A 1982 The median eminence as a model to study presynaptic regulation of neural peptide release. Peptides 3:305-310
- Negro-Vilar A, Ojeda SR, McCann SM 1979 Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone-releasing hormone release by median eminence terminals in vitro. Endocrinology 104:1749-1757
- Nikolarakis KE, Almeida OF, Herz A 1986 Stimulation of hypothalamic beta-endorphin and dynorphin release by corticotropin-releasing factor (in vitro). Brain Res 399:152-155
- Nikolarakis KE, Almeida OF, Herz A 1986a Corticotropin-releasing factor (CRF) inhibits gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release from superfused rat hypothalamus in vitro. Brain Res 377:388-390
- Nikolics K, Mason AJ, Szönyi E, Ramachandran J, Seeburg PH 1985 A prolactin-inhibiting factor within the precursor for human gonadotropin-releasing hormone. Nature, 316:511-517
- Ohtsuka S, Miyake A, Nishizaki T, Tasaka K, Aono T, Tanizawa O 1987 Substance P stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat hypothalamus in vitro with involvement of oestrogen. Acta Endocrinol 115:247-252
- Ojeda SR 1994 The neurobiology of mammalian puberty : has the contribution of glial cells been underestimated ? J NIH Res 6: 51-56.
- Ojeda SR, Negro-Vilar A 1985 Prostaglandin E2-induced luteinizing hormone-releasing hormone release involves mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup>. Endocrinology 116:1763-1770
- Ojeda SR, Negro-Vilar A, McCann SM 1979 Release of prostaglandin Es by hypothalamic tissue: evidence for their involvement in catecholamine-induced luteinizing hormone-releasing hormone release. Endocrinology 104:617-624
- Ojeda SR, Negro-Vilar A, McCann SM 1982 Evidence for involvement of alpha-adrenergic receptors in norepinephrine-induced prostaglandin E2 and luteinizing hormone-releasing hormone release from the median eminence. Endocrinology 110:409-412

- Ojeda SR, Urbanski HF, Costa ME, Hill DF, Moholt-Siebert M 1990 Involvement of transforming growth factor alpha in the release of luteinizing hormone-releasing hormone from the developing female hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9698-9702
- Ojeda SR, Urbanski HF, Katz KH, Costa ME 1986 Activation of estradiol-positive feedback at puberty: estradiol sensitizes the LHRH-releasing system at two different biochemical steps. *Neuroendocrinology* 43:259-265
- Ojeda SR, Urbanski HF, Katz KH, Costa ME 1988 Prostaglandin E2 releases luteinizing hormone-releasing hormone from the female juvenile hypothalamus through a Ca<sup>2+</sup>-dependent, calmodulin-independent mechanism. *Brain Res* 441:339-351
- Olmos G, Naftolin F, Perez J, Tranque PA, Garcia-Segura LM 1989 Synaptic remodeling in the rat arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neuroscience* 32:663-667
- Ondo J, Mansky T, Wuttke W 1982 In vivo GABA release from the medial preoptic area of diestrous and ovariectomized rats. *Exp Brain Res* 46:69-72
- Ondo JG 1974 Gamma-aminobutyric acid effects on pituitary gonadotropin secretion. *Science* 186:738-739
- Ondo JG, Pass KA, Baldwin R 1976 The effects of neurally active amino acids on pituitary gonadotropin secretion. *Neuroendocrinology* 21:79-87
- Papapetropoulos A, Desai KM, Rudic RD, Mayer B, Zhang R, Ruiz-Torres MP, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC 1997 Nitric oxide synthase inhibitors attenuate transforming-growth-factor-beta 1-stimulated capillary organization in vitro. *Am J Pathol* 150:1835-1844
- Parducz A, Perez J, Garcia-Segura LM 1993 Estradiol induces plasticity of gabaergic synapses in the hypothalamus. *Neuroscience* 53:395-401
- Park OK, Gugneja S, Mayo KE 1990 Gonadotropin-releasing hormone gene expression during the rat estrous cycle: effects of pentobarbital and ovarian steroids. *Endocrinology* 127:365-372
- Park OK, Ramirez VD 1989 Spontaneous changes in LHRH release during the rat estrous cycle, as measured with repetitive push-pull perfusions of the pituitary gland in the same female rats. *Neuroendocrinology*, 50:66-72
- Parnet P, Lenoir V, Palkovits M, Kerdelhue 1990 Estrous cycle variations in gonadotropin releasing hormone, substance P, and beta-endorphin contents in the median eminence, the

- arcuate nucleus and the medial preoptic nucleus in the rat : a detailed analysis of proestrus changes. *J Neuroendocrinol* 2:291-296
- Pau KY, Berria M, Hess DL, Spies HG 1993 Preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in ovarian-intact rhesus macaques. *Endocrinology* 133:1650-1656
- Perera AD, Plant TM 1997 Ultrastructural studies of neuronal correlates of the pubertal reaugmentation of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Comp Neurol* 385:71-82
- Petersen SL, Keller ML, Carder SA, McCrone S 1993 Differential effects of estrogen and progesterone on levels of POMC mRNA levels in the arcuate nucleus: relationship to the timing of LH surge release. *J Neuroendocrinol* 5:643-648
- Petraglia F, Sutton S, Vale W, Plotsky P 1987 Corticotropin-releasing factor decreases plasma luteinizing hormone levels in female rats by inhibiting gonadotropin-releasing hormone release into hypophysial-portal circulation. *Endocrinology* 120:1083-1088
- Peunova N, Enikolopov G 1993 Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. *Nature* 364:450-453
- Phelps CP, Kalra SP, Kalra PS 1992 In vivo pulsatile LHRH release into the anterior pituitary of the male rat: effects of castration. *Brain Res*, 569:159-163
- Ping L, Mahesh VB, Brann DW 1994 A physiological role for N-methyl-D-aspartic acid and non-N-methyl-D-aspartic acid receptors in pulsatile gonadotropin secretion in the adult female rat. *Endocrinology* 135:113-118
- Pixley SK, de Vellis J 1984 Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res* 317:201-209
- Poppa V, Miyashiro JK, Corson MA, Berk BC 1998 Endothelial NO synthase is increased in regenerating endothelium after denuding injury of the rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1312-1321
- Porkka-Heiskanen T, Urban JH, Turek FW, Levine JE 1994 Gene expression in a subpopulation of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons prior to the preovulatory gonadotropin surge. *J Neurosci* 14:5548-5558
- Pu S, Horvath TL, Diano S, Naftolin F, Kalra PS, Kalra SP 1997 Evidence showing that beta-endorphin regulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) efflux:



- anatomical and functional support for an interaction between opiates and nitric oxide. *Endocrinology* 138:1537-1543
- Pu S, Kalra PS, Kalra SP 1998a Ovarian steroid-independent diurnal rhythm in cyclic GMP/nitric oxide efflux in the medial preoptic area: possible role in preovulatory and ovarian steroid-induced LH surge. *J Neuroendocrinol* 10:617-625
- Pu S, Kalra PS, Kalra SP 1998b Diurnal rhythm in cyclic GMP/nitric oxide efflux in the medial preoptic area of male rats. *Brain Res* 808:310-312
- Pu S, Xu B, Kalra SP, Kalra PS 1996 Evidence that gonadal steroids modulate nitric oxide efflux in the medial preoptic area: effects of N-methyl-D-aspartate and correlation with luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 137:1949-1955
- Purnelle G, Gerard A, Czajkowski V, Bourguignon JP 1997 Pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone by rat hypothalamic explants without cell bodies of GnRH neurons. *Neuroendocrinology* 66:305-312
- Raber J, Koob GF, Bloom FE 1995 Interleukin-2 (IL-2) induces corticotropin-releasing factor (CRF) release from the amygdala and involves a nitric oxide-mediated signaling; comparison with the hypothalamic response. *J Pharmacol Exp Ther* 272:815-824
- Radovick S, Ticknor CM, Nakayama Y, Notides AC, Rahman A, Weintraub BD, Cutler GB Jr, Wondisford FE 1991 Evidence for direct estrogen regulation of the human gonadotropin-releasing hormone gene. *J Clin Invest* 88:1649-1655
- Radovick S, Wray S, Muglia L, Westphal H, Olsen B, Smith E, Patriquin E, Wondisford FE 1994 Steroid hormone regulation and tissue-specific expression of the human GnRH gene in cell culture and transgenic animals. *Horm Behav* 28:520-529
- Rage F, Hill DF, Sena-Esteves M, Breakefield XO, Coffey RJ, Costa ME, McCann SM, Ojeda SR 1997b Targeting transforming growth factor alpha expression to discrete loci of the neuroendocrine brain induces female sexual precocity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2735-2740
- Rage F, Lee BJ, Ma YJ, Ojeda SR 1997 Estradiol enhances prostaglandin E2 receptor gene expression in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons and facilitates the LHRH response to PGE2 by activating a glia-to-neuron signaling pathway. *J Neurosci* 17:9145-9156

- Ramirez VD, Dluzen D, Lin D 1980 Progesterone administration in vivo stimulates release of luteinizing hormone-releasing hormone in vitro. *Science* 208:1037-1039
- Ramsell K. D. and Cobbett P. (1996) Nitric oxide induces morphological changes in cultured neurohypophysial astrocytes. *J. Neuroendocrinol* 8:235-240
- Rance N, Wise PM, Selmanoff MK, Barraclough CA 1981 Catecholamine turnover rates in discrete hypothalamic areas and associated changes in median eminence luteinizing hormone-releasing hormone and serum gonadotropins on proestrus and diestrus day 1. *Endocrinology* 108:1795-1802
- Rasmussen DD 1993 Episodic gonadotropin-releasing hormone release from the rat isolated median eminence in vitro. *Neuroendocrinology* 58:511-518
- Rasmussen DD, Kennedy BP, Ziegler MG, Nett TM 1988 Endogenous opioid inhibition and facilitation of gonadotropin-releasing hormone release from the median eminence in vitro: potential role of catecholamines. *Endocrinology* 123:2916-2921
- Rasmussen DD, Yen SS 1983 Progesterone and 20 alpha-hydroxyprogesterone stimulate the in vitro release of GnRH by the isolated mediobasal hypothalamus. *Life Sci* 32:1523-1530
- Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER 1999 Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 13:307-319
- Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S 1990 Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101:746-752
- Reilly JF, Maher PA, Kumari VG 1998 Regulation of astrocyte GFAP expression by TGF-beta1 and FGF-2. *Glia* 22:202-210
- Rettori V, Belova N, Dees WL, Nyberg CL, Gimeno M, McCann SM 1993 Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10130-10134
- Rettori V, Canteros G, Renoso R, Gimeno M, McCann SM 1997 Oxytocin stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from medial basal hypothalamic explants by releasing nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2741-2744

- Rettori V, Gimeno M, Lyson K, McCann SM 1992 Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E2 release from the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11543-11546
- Rinne UK 1966 Ultrastructure of the median eminence of the rat. *Z Zellforsch* 74:98-122
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, et al 1986 Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4167-4171
- Rogers MC, Silverman AJ, Gibson MJ 1997 Gonadotropin-releasing hormone axons target the median eminence: in vitro evidence for diffusible chemoattractive signals from the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 138:3956-3966
- Romero MT, Silverman AJ, Wise PM, Witkin JW 1994 Ultrastructural changes in gonadotropin-releasing hormone neurons as a function of age and ovariectomy in rats. *Neuroscience* 58:217-225
- Ronnekleiv OK, Naylor BR, Bond CT, Adelman JP 1989 Combined immunohistochemistry for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and pro-GnRH, and in situ hybridization for GnRH messenger ribonucleic acid in rat brain. *Mol Endocrinol*, 3:363-371
- Rostene WH, Alexander MJ 1997 Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol* 18:115-173
- Rotsztein WH, Charli JL, Pattou E, Epelbaum J, Kordon C 1976 In vitro release of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) from rat mediobasal hypothalamus: effects of potassium, calcium and dopamine. *Endocrinology* 99:1663-1666
- Rotsztein WH, Drouva SV, Pattou E, Kordon C 1978 Met-enkephalin inhibits in vitro dopamine-induced LHRH release from mediobasal hypothalamus of male rats. *Nature* 274:281-282
- Rubin BS 1993 Naloxone stimulates comparable release of luteinizing hormone-releasing hormone from tissue fragments from ovariectomized, estrogen-treated young and middle-aged female rats. *Brain Res* 601:246-254
- Rubin BS, King JC 1995 A relative depletion of luteinizing hormone-releasing hormone was observed in the median eminence of young but not middle-aged rats on the evening of proestrus. *Neuroendocrinology* 62:259-269

- Rubin BS, Mitchell S, Lee CE, King JC 1995 Reconstructions of populations of luteinizing hormone releasing hormone neurons in young and middle-aged rats reveal progressive increases in subgroups expressing Fos protein on proestrus and age-related deficits. *Endocrinology* 136:3823-3830
- Sabatino FD, Collins P, McDonald JK 1989 Neuropeptide-Y stimulation of luteinizing hormone-releasing hormone secretion from the median eminence in vitro by estrogen-dependent and extracellular Ca<sup>2+</sup>-independent mechanisms. *Endocrinology* 124:2089-2098
- Sabatino FD, Collins P, McDonald JK 1990 Investigation of the effects of progesterone on neuropeptide Y-stimulated luteinizing hormone-releasing hormone secretion from the median eminence of ovariectomized and estrogen-treated rats. *Neuroendocrinology* 52:600-607
- Sahu A, Crowley WR, Kalra PS, Kalra SP 1992 A selective sexually dimorphic response in the median eminence neuropeptide Y. *Brain Res* 573:235-242
- Sahu A, Crowley WR, Kalra SP 1990 An opioid-neuropeptide-Y transmission line to luteinizing hormone (LH)-releasing hormone neurons: a role in the induction of LH surge. *Endocrinology* 126:876-883
- Sahu A, Crowley WR, Kalra SP 1994 Hypothalamic neuropeptide-Y gene expression increases before the onset of the ovarian steroid-induced luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 134:1018-1022
- Sahu A, Crowley WR, Tatemoto K, Balasubramaniam A, Kalra SP 1987 Effects of neuropeptide Y, NPY analog (norleucine<sup>4</sup>-NPY), galanin and neuropeptide K on LH release in ovariectomized (ovx) and ovx estrogen, progesterone-treated rats. *Peptides* 8:921-926
- Sahu A, Kalra SP 1992 Effects of tachykinins on luteinizing hormone release in female rats: potent inhibitory action of neuropeptide K. *Endocrinology* 130:1571-1577
- Sahu A, Kalra SP, Crowley WR, Kalra PS 1988 Evidence that NPY-containing neurons in the brainstem project into selected hypothalamic nuclei: implication in feeding behavior. *Brain Res* 457:376-378

- Sahu A, Kalra SP, Crowley WR, Kalra PS 1989 Testosterone raises neuropeptide-Y concentration in selected hypothalamic sites and in vitro release from the medial basal hypothalamus of castrated male rats. *Endocrinology* 124:410-414
- Sahu A, Xu B, Kalra SP 1994 Role of galanin in stimulation of pituitary luteinizing hormone secretion as revealed by a specific receptor antagonist, galantide. *Endocrinology* 134:529-536
- Saitoh Y, Silverman AJ, Gibson MJ 1991 Norepinephrine neurons in mouse locus coeruleus express c-fos protein after N-methyl-D,L-aspartic acid (NMDA) treatment: relation to LH release. *Brain Res* 561:11-19
- Sanghera MK, Simpson ER, McPhaul MJ, Kozlowski G, Conley AJ, Lephart ED 1991 Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology* 129:2834-2844
- Sannella MI, Petersen SL 1997 Dual label in situ hybridization studies provide evidence that luteinizing hormone-releasing hormone neurons do not synthesize messenger ribonucleic acid for mu, kappa, or delta opiate receptors. *Endocrinology* 138:1667-1672
- Sarkar DK, Chiappa SA, Fink G, Sherwood NM 1976 Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. *Nature*, 264:461-463
- Sarkar DK, Fink G 1980 Luteinizing hormone releasing factor in pituitary stalk plasma from long-term ovariectomized rats: effects of steroids. *J Endocrinol* 86:511-524
- Sarkar DK, Fink G 1981 Gonadotropin-releasing hormone surge: possible modulation through postsynaptic alpha-adrenoreceptors and two pharmacologically distinct dopamine receptors. *Endocrinology* 108:862-867
- Sarkar DK, Gottschall PE, Meites J, Horn A, Dow RC, Fink G, Cuello AC 1983 Uptake and release of [3H]dopamine by the median eminence: evidence for presynaptic dopaminergic receptors and for dopaminergic feedback inhibition. *Neuroscience* 10:821-830
- Sarkar DK, Minami S 1995 Diurnal variation in luteinizing hormone-releasing hormone and beta-endorphin release in pituitary portal plasma during the rat estrous cycle. *Biol Reprod* 53:38-45
- Scarborough K, Jakubowski M, Levin N, Wise PM, Roberts JL 1994 The effect of time of day on levels of hypothalamic proopiomelanocortin primary transcript, processing

- intermediate and messenger ribonucleic acid in proestrous and estrous rats. *Endocrinology* 134:555-561
- Schally AV 1978 Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. *Science* 202:18-28
- Schally AV, Nair RM, Redding TW, Arimura A 1971 Isolation of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone-releasing hormone from porcine hypothalami. *J Biol Chem* 246:7230-7236
- Schuman EM, Madison DV 1994 Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17:153-183
- Scott CJ, Clarke IJ 1993 Inhibition of luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes during the breeding season by gamma-aminobutyric acid (GABA) is mediated by GABA-A receptors, but not GABA-B receptors. *Endocrinology* 132:1789-1796
- Seeburg PH, Adelman JP 1984 Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. *Nature*, 311:666-668
- Seilicovich A, Duvilanski BH, Pisera D, Theas S, Gimeno M, Rettori V, McCann SM 1995 Nitric oxide inhibits hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release by releasing gamma-aminobutyric acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3421-3424
- Sherwood NM, Lovejoy DA, Coe IR 1993 Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocr Rev* 14:241-254
- Shim C, Choi D, Kwon HB, Kim K 1997 Expression of laminin chain-specific gene transcripts in mouse uterine tissues during peri-implantation period. *Mol Reprod Dev* 48:176-184
- Shivers BD, Harlan RE, Morrell JI, Pfaff DW 1983 Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature* 304:345-347
- Shupnik MA 1996 Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone. *Biol Reprod* 54:279-286
- Sievertsson H, Chang JK, Bogentoft C, Currie BL, Folkers K 1971 Synthesis of the luteinizing releasing hormone of the hypothalamus and its hormonal activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 44:1566-1571

- Silverman AJ, Jhamandas J, Renaud LP 1987 Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. *J Neurosci*, 7(8):2312-2319
- Silverman RC, Gibson MJ, Silverman AJ 1991 Relationship of glia to GnRH axonal outgrowth from third ventricular grafts in hpg hosts. *Exp Neurol* 114:259-274
- Simerly RB, Gorski RA, Swanson LW 1986 Neurotransmitter specificity of cells and fibers in the medial preoptic nucleus: an immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 246:343-363
- Simerly RB, McCall LD, Watson SJ 1988 Distribution of opioid peptides in the preoptic region: immunohistochemical evidence for a steroid-sensitive enkephalin sexual dimorphism. *J Comp Neurol* 276:442-459
- Simerly RB, Swanson LW 1987 The distribution of neurotransmitter-specific cells and fibers in the anteroventral periventricular nucleus: implications for the control of gonadotropin secretion in the rat. *Brain Res* 400:11-34
- Simonian SX, Herbison AE 1997 Differential expression of estrogen receptor and neuropeptide Y by brainstem A1 and A2 noradrenaline neurons. *Neuroscience* 76:517-529
- Skofitsch G, Jacobowitz DM 1985 Immunohistochemical mapping of galanin-like neurons in the rat central nervous system. *Peptides* 6:509-546
- Smith AI, Funder JW 1988 Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr Rev* 9:159-179
- Smith MS, Freeman ME, Neill JD 1975 The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96:219-226
- Stefano GB, Digenis A, Spector S, Leung MK, Bilfinger TV, Makman MH, Scharrer B, Abumrad NN 1993 Opiate-like substances in an invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11099-11103
- Stefano GB, Hartman A, Bilfinger TV, Magazine HI, Liu Y, Casares F, Goligorsky MS 1995 Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation. *J Biol Chem* 270:30290-30293

- Steiner RA, Bremner WJ, 1982 Clifton DK Regulation of luteinizing hormone pulse frequency and amplitude by testosterone in the adult male rat. *Endocrinology*, 111:2055-2061
- Stevens BR, Vo CB 1998 Membrane transport of neuronal nitric oxide synthase substrate L-arginine is constitutively expressed with CAT1 and 4F2hc, but not CAT2 or rBAT. *J Neurochem* 71:564-570
- Stoeckart R, Jansen HG, Kreike AJ 1972 Ultrastructural evidence for exocytosis in the median eminence of the rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 131:99-107
- Sullivan KA, Witkin JW, Ferin M, Silverman AJ 1995 Gonadotropin-releasing hormone neurons in the rhesus macaque are not immunoreactive for the estrogen receptor. *Brain Res* 685:198-200
- Sunshine J, Balak K, Rutishauser U, Jacobson M 1987 Changes in neural cell adhesion molecule (NCAM) structure during vertebrate neural development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5986-5990
- Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M 1995 Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone gene expression during rat estrous cycle. *Endocr J* 42:789-796
- Takumi T, Moustakas A, Lin HY, Lodish HF 1995 Molecular characterization of a type I serine-threonine kinase receptor for TGF-beta and activin in the rat pituitary tumor cell line GH3. *Exp Cell Res* 216:208-214
- Theodosios DT, Poulain DA 1993 Activity-dependent neuronal-glia and synaptic plasticity in the adult mammalian hypothalamus. *Neuroscience* 57:501-535
- Thind KK, Goldsmith PC 1988 Infundibular gonadotropin-releasing hormone neurons are inhibited by direct opioid and autoregulatory synapses in juvenile monkeys. *Neuroendocrinology* 47:203-216
- Toru-Delbauffe D, Baghdassarian D, Both D, Bernard R, Rouget P, Pierre M 1992 Effects of TGF beta 1 on the proliferation and differentiation of an immortalized astrocyte cell line: relationship with extracellular matrix. *Exp Cell Res* 202:316-325
- Tramu G, Beauvillain JC, Croix D, Leonardelli J 1981 Comparative immunocytochemical localization of enkephalin and somatostatin in the median eminence, hypothalamus and adjacent areas of the guinea-pig brain. *Brain Res* 215:235-255



- Tramu G, Beauvillain JC, Croix D, Pillez A, Garaud JC 1984 Arguments immunohistochimiques en faveur de la colocalisation de neuropeptides dans les neurones du système hypothalamo-infundibulaire. *Ann Endocrinol (Paris)* 45:175-87
- Tramu G, Beauvillain JC, Croix D, Pillez A, Garaud JC 1984 Immunohistochemical arguments in favor of co-localization of neuropeptides in hypothalamo-infundibular neuron systems. *Ann Endocrinol* 45:175-187
- Treiser SL, Wardlaw SL 1992 Estradiol regulation of proopiomelanocortin gene expression and peptide content in the hypothalamus. *Neuroendocrinology* 55:167-173
- Tsai PS, Werner S, Weiner RI 1995 Basic fibroblast growth factor is a neurotropic factor in GT1 gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines. *Endocrinology* 136:3831-3838
- Tsuruo Y, Hisano S, Nakanishi J, Katoh S, Daikoku S 1987 Immunohistochemical studies on the roles of substance P in the rat hypothalamus: possible implication in the hypothalamic-hypophysial-gonadal axis. *Neuroendocrinology* 45:389-401
- Tsuruo Y, Kawano H, Hisano S, Kagotani Y, Daikoku S, Zhang T, Yanaihara N 1991 Substance P-containing neurons innervating LHRH-containing neurons in the septo-preoptic area of rats. *Neuroendocrinology* 53:236-245
- Tsuruo Y, Kawano H, Kagotani Y, Hisano S, Daikoku S, Chihara K, Zhang T, Yanaihara N 1990 Morphological evidence for neuronal regulation of luteinizing hormone-releasing hormone-containing neurons by neuropeptide Y in the rat septo-preoptic area. *Neurosci Lett* 110:261-266
- Ugrumov M, Hisano S, Daikoku S 1989 Topographic relations between tyrosine hydroxylase- and luteinizing hormone-releasing hormone-immunoreactive fibers in the median eminence of adult rats. *Neurosci Lett* 102:159-164
- Urban JH, Das I, Levine JE 1996 Steroid modulation of neuropeptide Y-induced luteinizing hormone releasing hormone release from median eminence fragments from male rats. *Neuroendocrinology* 63:112-119
- Vale W, Rivier C, Hsueh A, Campen C, Meunier H, Bicsak T, Vaughan J, Corrigan A, Bardin W, Sawchenko P, et al 1988 Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Recent Prog Horm Res* 44:1-34
- van den Pol AN, Wuarin JP, Dudek FE 1990 Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Science* 250:1276-1278

- Vandenbulcke F, Ciofi P, Beauvillain JC 1994 Detection of neutral endopeptidase (NEP, enkephalinase, E.C.3.4.24.11) in relation to dopaminergic and gonadoliberinergic nerve endings in the median eminence of the male rat: a double labeling ultrastructural study. *J Neuroendocrinol* 6:655-664
- Vandenbulcke F, Pollard H, Mitchell V, Beauvillain JC 1993 Radioimmunocytochemical distribution of neutral endopeptidase (enkephalinase E.C.3.4.24.11) at the ultrastructural level in the rat median eminence. *J Neuroendocrinol* 5:205-212
- Voigt P, Ma YJ, Gonzalez D, Fahrenbach WH, Wetsel WC, Berg-von der Emde K, Hill DF, Taylor KG, Costa ME, Seidah NG, Ojeda SR 1996 Neural and glial-mediated effects of growth factors acting via tyrosine kinase receptors on luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 137:2593-2605
- Wang HJ, Hoffman GE, Smith MS 1995 Increased GnRH mRNA in the GnRH neurons expressing cFos during the proestrous LH surge. *Endocrinology* 136:3673-3676
- Warberg J, Eskay RL, Barnea A, Reynolds RC, Porter JC 1977 Release of luteinizing hormone releasing hormone and thyrotropin releasing hormone from a synaptosome-enriched fraction of hypothalamic homogenates. *Endocrinology* 100:814-825
- Warembourg M, Leroy D, Peytevin J, Martinet L 1998 Estrogen receptor and progesterone receptor-immunoreactive cells are not co-localized with gonadotropin-releasing hormone in the brain of the female mink (*Mustela vison*). *Cell Tissue Res* 291:33-41
- Watanobe H, Takebe K 1993 In vivo release of neurotensin from the median eminence of ovariectomized estrogen-primed rats as estimated by push-pull perfusion: correlation with luteinizing hormone and prolactin surges. *Neuroendocrinology* 57:760-764
- Watson RE Jr, Wiegand SJ, Hoffman GE 1988 Ontogeny of a sexually dimorphic opioid system in the preoptic area of the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 44:49-58
- Watson RE, Langub MC, Landis JW 1992 Further evidence that most luteinizing hormone-releasing hormone neurons are not directly estrogen-responsive: simultaneous localization of luteinizing hormone-releasing hormone and estrogen-receptor immunoreactivity in the guinea-pig brain. *J Neuroendocrinol* 4:311-318
- Weesner GD, Krey LC, Pfaff DW 1993 Alpha 1 adrenergic regulation of estrogen-induced increases in luteinizing hormone-releasing hormone mRNA levels and release. *Brain Res Mol Brain Res* 17:77-82

- Weiland NG, Wise PM 1990 Estrogen and progesterone regulate opiate receptor densities in multiple brain regions. *Endocrinology* 126:804-808
- Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S 1994 Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5212-5216
- Weiner RI, Martinez de la Escalera G 1993 Pulsatile release of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) is an intrinsic property of GT1 GnRH neuronal cell lines. *Hum Reprod* 8:13-7
- Wetsel WC, Hill DF, Ojeda SR 1996 Basic fibroblast growth factor regulates the conversion of pro-luteinizing hormone-releasing hormone (Pro-LHRH) to LHRH in immortalized hypothalamic neurons. *Endocrinology* 137:2606-2616
- White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD 1998 Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(1):305-309
- Wierman ME, Kepa JK, Sun W, Gordon DF, Wood WM 1992 Estrogen negatively regulates rat gonadotropin releasing hormone (rGnRH) promoter activity in transfected placental cells. *Mol Cell Endocrinol* 86:1-10
- Wilcox JN, Roberts JL 1985 Estrogen decreases rat hypothalamic proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 117:2392-2396
- Williamson P, Lang J, Boyd Y 1991 The gonadotropin-releasing hormone (Gnrh) gene maps to mouse chromosome 14 and identifies a homologous region on human chromosome 8. *Somat Cell Mol Genet*, 17:609-615
- Wise PM, Rance N, Barraclough CA 1981 Effects of estradiol and progesterone on catecholamine turnover rates in discrete hypothalamic regions in ovariectomized rats. *Endocrinology* 108:2186-2193
- Wise PM, Scarbrough K, Weiland NG, Larson GH 1990 Diurnal pattern of proopiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of proestrous, ovariectomized, and steroid-treated rats: a possible role in cyclic luteinizing hormone secretion. *Mol Endocrinol* 4:886-892
- Witkin JW 1990 Access of luteinizing hormone-releasing hormone neurons to the vasculature in the rat. *Neuroscience*, 37:501-506

- Witkin JW 1992 Increased synaptic input to gonadotropin-releasing hormone neurons in aged, virgin, male Sprague-Dawley rats. *Neurobiol Aging* 13:681-686
- Witkin JW, Ferin M, Popilskis SJ, Silverman AJ 1991 Effects of gonadal steroids on the ultrastructure of GnRH neurons in the rhesus monkey: synaptic input and glial apposition. *Endocrinology* 129:1083-1092
- Witkin JW, O'Sullivan H, Miller R, Ferin M 1997 GnRH perikarya in medial basal hypothalamus of pubertal female rhesus macaque are ensheathed with glia. *J Neuroendocrinol* 9:881-885
- Witkin JW, Paden CM, Silverman AJ 1982 The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinology*, 35:429-438
- Witkin JW, Romero MT 1995 Comparison of ultrastructural characteristics of gonadotropin-releasing hormone neurons in prepubertal and adult male rats. *Neuroscience* 64:1145-1151
- Wittkowski W, Scheuer A 1974 Functional changes of the neuronal and glial elements at the surface of the external layer of the median eminence. *Z Anat Entwicklungsgesch* 143:255-62
- Wong M, Moss RL 1991 Electrophysiological evidence for a rapid membrane action of the gonadal steroid, 17 beta-estradiol, on CA1 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *Brain Res* 543:148-152
- Wray S, Hoffman GE 1983 Organization and interrelationship of neuropeptides in the central amygdaloid nucleus of the rat. *Peptides*, 4(4):525-541
- Wright DE, Jennes L 1993 Origin of noradrenergic projections to GnRH perikarya-containing areas in the medial septum-diagonal band and preoptic area. *Brain Res* 621:272-278
- Xia L, Van Vugt D, Alston EJ, Luckhaus J, Ferin M 1992 A surge of gonadotropin-releasing hormone accompanies the estradiol-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey.
- Xu B, Pu S, Kalra PS, Hyde JF, Crowley WR, Kalra SP 1996 An interactive physiological role of neuropeptide Y and galanin in pulsatile pituitary luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 137:5297-52302
- Xu B, Sahu A, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP 1996 Disinhibition from opioid influence augments hypothalamic neuropeptide Y (NPY) gene expression and pituitary luteinizing

- hormone release: effects of NPY messenger ribonucleic acid antisense oligodeoxynucleotides. *Endocrinology* 137:78-84
- Yamada K, Emson P, Hokfelt T 1996 Immunohistochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat hypothalamus and colocalization with neuropeptides. *J Chem Neuroanat* 10:295-316
- Yang EY, Moses HL 1990 Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J Cell Biol* 111:731-741
- Yang-Feng TL, Seeburg PH, Francke U 1986 Human luteinizing hormone-releasing hormone gene (LHRH) is located on short arm of chromosome 8 (region 8p11.2----p21). *Somat Cell Mol Genet*, 12:95-100
- Yeoman RR, Jenkins AJ 1989 Arcuate area of the female rat maintained in vitro exhibits increased afternoon electrical activity. *Neuroendocrinology* 49:144-149
- Ying SY, Zhang Z 1995 Activin and activin receptors in the normal urinary bladder: immunohistochemistry, in situ hybridization, and RT-PCR. *Life Sci* 57:1599-1603
- Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM 1997a Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1023-1028
- Yu WH, Walczewska A, Karanth S, McCann SM 1997b Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland. *Endocrinology* 138:5055-5058
- Zanisi M, Messi E, Motta M, Martini L 1987 Ultrashort feedback control of luteinizing hormone-releasing hormone secretion in vitro. *Endocrinology* 121:2199-2204
- Zoeller RT, Young WS 3d 1988 Changes in cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding gonadotropin-releasing hormone in the anterior hypothalamus of female rats during the estrous cycle. *Endocrinology* 123:1688-1689

